

Aus dem Institut für Veterinärmedizin
des Bundesgesundheitsamtes
(Robert von Ostertag-Institut)
Direktor: Prof. Dr. D. Großklaub

UNTERSUCHUNGEN BEIM RIND ZUM VERHALTEN VON ARZNEIMITTELN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ART UND VOM ORT DER APPLIKATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gabriele Mölle
Tierärztin aus Augsburg

Berlin 1983
Journal-Nr. 1140



Aus dem Institut für Veterinärmedizin
des Bundesgesundheitsamtes
(Robert von Ostertag - Institut)
Direktor: Prof. Dr. D.Großklaus

UNTERSUCHUNGEN BEIM RIND ZUM VERHALTEN
VON ARZNEIMITTELN IN ABHÄNGIGKEIT VON
DER ART UND VOM ORT DER APPLIKATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gabriele Mölle
Tierärztin aus Augsburg

Berlin 1983
Journal-Nr. 1140

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:

Prof. Dr. F. Hörchner

Referent:

Prof. Dr. K.-H. Lotthammer

Korreferent:

Prof. Dr. B. Hoffmann

Tag der Promotion:

5. September 1983

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	S.
1. Vorbemerkung	11
2. Literatur	12
2.1. Einteilung und Struktur, Wirkungsspektrum und antimikrobiell wirksame Konzentrationen der ver- wendeten Arzneimittel	12
2.1.1. Penicilline	12
2.1.2. Aminoglycosid-Antibiotika	17
2.1.3. Tetracycline	19
2.2. Aspekte zur Bewertung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen in eßbaren Geweben und Produkten(nach Anwendung penicillin-, aminoglycosid- und tetracyclinhaltiger Tierarznei- mittel).....	24
2.2.1. Bewertung im Hinblick auf den Ver- braucherschutz	24
2.2.1.1. Penicilline	24
2.2.1.2. Aminoglycosid-Antibiotika	26
2.2.1.3. Tetracycline	27
2.2.2. Bewertung antimikrobiell wirksamer Rückstände im Hinblick auf die Weiter- verarbeitung des Lebensmittels	29
2.3. Wirkstoffkonzentrationen in Blut- plasma, Milch und eßbaren Geweben nach i.m.- und s.c.-Verabreichung	30
2.3.1. Allgemeine Angaben zur Pharmakokine- tik	30
2.3.2. Besondere Abhängigkeiten in bezug zur Resorption und Darreichungsform des Arzneimittels	32
2.3.3. Ergebnisse spezieller Untersuchungen ...	39
2.3.3.1. Penicilline	39

	S.
2.3.3.1.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma	39
2.3.3.1.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch	44
2.3.3.1.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben	47
2.3.3.2. Aminoglycosidantibiotika	52
2.3.3.2.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma	52
2.3.3.2.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch	54
2.3.3.2.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben	56
2.3.3.3. Tetracycline	59
2.3.3.3.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma	59
2.3.3.3.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch	62
2.3.3.3.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben	65
2.4. Angaben zur Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln nach i.m.- und s.c.- Applikation in Abhängigkeit von der Applikationsstelle unter besonderer Berücksichtigung der Situation beim Rind	67
3. Eigene Untersuchungen (Material und Methodik)....	72
3.1. Durchführung der Tierversuche (Versuchsplan)	
3.1.1. Versuchstiere	72
3.1.2. Verwendete Arzneimittel	72
3.1.3. Behandlungsschema	83
3.1.4. Versuchsdurchführung bei akut erkrankten Tieren	84
3.1.5. Gewinnung der Blutplasma-, Milch-, Muskulatur- und Organproben	89
3.1.5.1. Gewinnung und Konservierung der Blutplasma- proben	89

	S.
3.1.5.2. Gewinnung und Konservierung der Milchproben	90
3.1.5.3. Gewinnung, Konservierung und Aufarbeitung der Fleisch- und Organproben.....	91
3.2. Prinzip der Durchführung der Hemmstoffnachweise in Fleisch, Organen, Blutplasma und Milch	92
3.2.1. Hemmstofftest nach den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz .	93
3.2.2. Blättchentest	93
3.2.3. Agarlochtest	94
3.2.4. Brillantschwarzreduktionstest	95
3.3. Ansatz der Verdünnungsreihen	95
3.3.1. Versuche zum Ansatz der Verdünnungsreihen der verwendeten Arzneimittel in verschiedenen Medien und Festlegung auf den Blättchentest bzw. Agarlochtest	96
3.3.2. Vorversuche zur Hemmung der antibakteriellen Aktivität von Penicillin mit Penicillinase	106
3.3.3. Überprüfung der Haltbarkeit eingefrorener Plasma- und Milchproben.....	113
3.3.4. Testdurchführung	123
3.3.4.1. Besondere Materialien und Reagenzien ..	123
3.3.4.2. Durchführung des Allgemeinen Hemmstofftests	127
3.3.4.3. Blättchentest	127
3.3.4.4. Agarlochtest	128
3.3.4.5. Brillantschwarzreduktionstest.....	129
3.4. Auswertung der Untersuchungen und Bestimmung der Zuverlässigkeit	130
3.4.1. Auswertung des Hemmstofftests, des Blättchentests und des Agarlochtests...	130
3.4.2. Auswertung des Brillantschwarzreduktionstests	132

	S.
3.4.3.	Bestimmung der Zuverlässigkeit 132
3.5.	Biometrische Auswertung 143
3.6.	Auswertung des Formblatts zur "praktischen Durchführbarkeit" 145
4.	Untersuchungsergebnisse 148
4.1.	Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der untersuchten Arzneimittel 148
4.1.1.	Allgemeine Angaben 148
4.1.1.1.	Versuch 1 (Ampicillin-Trihydrat) 148
4.1.1.2.	Versuch 2 (Procain Penicillin G) 153
4.1.1.3.	Versuch 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G) 154
4.1.1.4.	Versuch 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin) 161
4.1.1.5.	Versuch 5 (Oxytetracyclin) 173
4.1.1.6.	Versuch 6 (Oxytetracyclin-Langzeitpräparation) 175
4.1.1.7.	Ergebnisse der Untersuchungen bei akut erkrankten Tieren 176
4.2.	Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte 180
4.3.	Wirkstoffkonzentrationen in der Milch. 199
4.4.	Rückstände in Muskulatur und Organen der geschlachteten Versuchstiere aus den Versuchen 1 - 6 206
4.5.	Ergebnis der Auswertung des Formblatts zur "praktischen Durchführbarkeit"..... 210

	S.
5. Diskussion	214
5.1. Diskussion der Methodik.....	214
5.2. Diskussion der Ergebnisse.....	220
5.3. Schlußfolgerungen	227
6. Zusammenfassung	230
7. Literaturverzeichnis	236
8. Anhang	251

1. Vorbemerkung

Mit der Verabschiedung der sogenannten Tierarzneimittelnovelle (Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 5. Juni 1974) wurde erstmals die gesetzliche Grundlage geschaffen, für alle auf dem Markt befindlichen und beim Lebensmittel liefernden Tier anzuwendenden Tierarzneimittel Wartezeiten festzusetzen.

Im Verlauf der Durchführung dieses Gesetzes zeigte sich, daß für zahlreiche Tierarzneimittel die "Depotbildung" am Ort der Applikation ein erhebliches Problem darstellte und daß dementsprechend lange Wartezeiten festzusetzen waren. Die damit eingeleitete Diskussion zeigte, daß der Verbleib von Wirkstoffen am Ort der Applikation ein bisher weitgehend ungelöstes Problem darstellt, wobei jedoch in vielen Fällen bei Verwerfung der Injektionsstelle zum Zeitpunkt der Schlachtung der restliche Tierkörper als tauglich anzusehen ist. Aus dieser Beobachtung resultierte die bereits jetzt z.T. eingeführte Praxis der Festsetzung getrennter Wartezeiten für die Injektionsstelle einerseits und den restlichen Tierkörper andererseits.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Problematik, inwieweit bei der Spezies Rind die Auswahl einer Injektionsstelle möglich ist, die sowohl bei der Schlachtung leicht wiederfindbar und problemlos verworfbar ist und andererseits eine adäquate Bioverfügbarkeit des verabreichten Arzneimittels garantiert.



2. Literatur

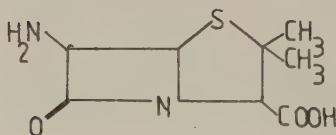
2.1. Einteilung und Struktur, Wirkungsspektrum und antimikrobiell wirksame Konzentrationen der verwendeten Arzneimittel

2.1.1. Penicilline

Penicilline gehören zu den in Human- und Veterinärmedizin am häufigsten angewandten antimikrobiell wirksamen Substanzen (Cannon und Hawkins 1962, Idsoe et al. 1969).

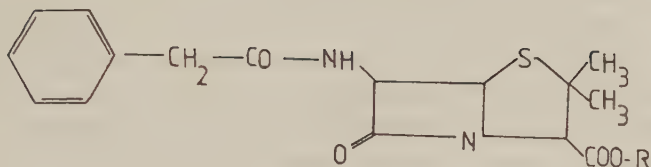
Ihre chemische Struktur ist durch den gemeinsamen Grundkörper, ein β -Lactam-Thiazolidin-Ringsystem, die 6-Aminopenicillansäure (siehe Abb. 1), gekennzeichnet.

Abb. 1



Bei den ersten für therapeutische Zwecke zur Verfügung stehenden Penicillinen handelte es sich um die Alkalisalze (Na und K) des Penicillin G (siehe Abb. 2) (Otten et al. 1975, Barza 1976).

Abb. 2



Die Penicilline lassen sich wie folgt einteilen (Forth et al. 1980):

1) biosynthetische Penicilline

Dazu gehören die Na- und K-Salze des Penicillin G (siehe Abb. 2) ebenso wie die sog. Depotpenicilline Procain Penicillin G und Benzathin Penicillin G (= Dibenzyl-äthylendiamin-di-Penicillin G) und das oral wirksame Penicillin V. Das Wirkungsspektrum dieser Penicilline umfaßt beinahe ausschließlich Keime des grampositiven Bereichs wie Streptokokken, Staphylokokken, Pneumokokken, Corynebakterien und Clostridien sowie Bac. anthracis und Erysipelotrix rhusiopathiae. Sie sind auch wirksam gegen die gramnegativen Neisserien und Haemophilus-Arten (Otten et al. 1975, Forth et al. 1980). Der Nachteil der zu dieser Gruppe gehörenden Verbindungen ist ihre Empfindlichkeit gegenüber Penicillinase. Die Penicillin- β -Lactamase, die zu einer Spaltung des β -Lactamrings führt, kann von bestimmten Mikroorganismen, u. a. Staphylokokken, gebildet werden (Otten et al. 1975, Barza 1976).

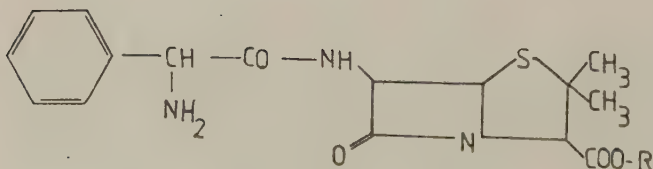
Die Angaben zur Dosierung dieser Penicilline erfolgen in internationalen Einheiten (I. E.), wobei 1 IE wie folgt definiert ist:

1 IE Penicillin G-Na und K entspricht 0,60 μ g
1 IE Procain Penicillin G entspricht 1 μ g
1 IE Benzathin Penicillin G entspricht 0,76 μ g
1 Penicillin V entspricht 0,59 μ g
(Merck Index 1976).

2) halbsynthetische Penicilline

Dies sind die Isoxazolympenicilline, deren Wirkungsspektrum auch penicillinasebildende Mikroorganismen umfaßt und die Penicilline mit breitem Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Keime wie Carbenicillin und Ampicillin. Das Ampicillin unterscheidet sich vom Penicillin G-Molekül durch eine zusätzliche Amino-Gruppe am Benzylrest (siehe Abb. 3). Sein Wirkungsspektrum umfaßt u. a. *E. coli*, *Proteus mirabilis*, Salmonellen, Shigellen, *Haemophilus influenzae* sowie die grampositiven Enterokokken und *Listeria*-Arten (Otten et al. 1975). Anders als bei den biosynthetischen Penicillinen erfolgen hier die Angaben zur Dosierung in Gewichtseinheiten (Merck Index 1976).

Abb. 3



Die Wirkungsweise der Penicilline und aller β -Lactam-Antibiotika beruht auf einer Hemmung der Zellwandbiosynthese bei proliferierenden Keimen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Endglied des Pentapeptids im Muraminsäurekomplex reagieren die Penicilline mit der entsprechenden Transpeptidase, die an das Penicillinmolekül irreversibel gebunden wird. Dadurch wird der Einbau der im Bakterien-Zytoplasma synthetisierten Muraminsäure in die Zellwand verhindert; aufgrund dieses Defekts kommt es schließlich zur Lysis der Zelle.

Die gute Wirkung gegenüber grampositiven Keimen wird dadurch erklärt, daß deren Zellwand etwa 10 bis 20mal soviel Mukopeptide enthält wie die gramnegativer Mikroorganismen (Körperzellen enthalten im Gegensatz zu Bakterienzellen keine Muramin-Mukopeptide) (Otten et al. 1975).

Über die notwendige Höhe therapeutisch wirksamer Konzentrationen im Blut werden unterschiedliche Angaben gemacht.

So reichen nach Hauschild (1973) Wirkstoffkonzentrationen von 0,8 IE/ml Plasma für eine bakterizide Wirkung gegenüber empfindlichen Keimarten aus. Ein über 24 bis 48 Stunden anhaltender Blutspiegel von 0,2 IE/ml soll in vielen Fällen auch hinsichtlich der zunächst überlebenden Keime (Persister¹⁾) ausreichend sein. Als minimale Grenzkonzentration in vivo wird sogar ein relativ niedriger Wert von 0,03 IE/ml angegeben (Hauschild 1973).

- 1) Die unter einer Penicillintherapie zunächst überlebenden Keime bezeichnet man als Persister. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um resistente Mikroorganismen. Nach Otten et al. (1975) überlebt im Blut etwa ein Keim unter einer Million die Therapie, während bei intrazellulär gelagerten Keimen etwa 5 bis 10 % Persister resultieren. Persister können, falls die Einwirkungsdauer und die Konzentration des Pharmakons nicht ausreichen, sich erneut vermehren. Daher ist es wichtig, über einen bestimmten Zeitraum eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Serum aufrecht zu halten.

Otten et al. (1975) weisen auf die Notwendigkeit ausreichender Einwirkungszeiten von Penicillin G und seiner Derivate hin. Unter in vivo-Bedingungen soll für eine bakterizide Wirkung gegen empfindliche Pneumokokken und Staphylokokken eine Einwirkungszeit von 4 bis maximal 8 Stunden ausreichen. Bei speziellen Situationen, z. B. einer durch intrazellulär gelegenen Streptokokken verursachten Endocarditis lenta, müssen jedoch über erheblich längere Zeiträume (24 Stunden) ausreichend hohe Blutspiegel aufrecht erhalten werden, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

Auch Otten et al. (1975) geben 0,03 IE/ml als einen noch wirksamen unteren Grenzwert gegenüber hochempfindlichen Keimen an. Weiterhin wird auf Unterschiede bezüglich der in vivo- und in vitro-MHK¹⁾ hingewiesen, wobei die letztere um den Faktor 5 bis 20 unter der in vivo feststellbaren MHK liegen kann.

Auch Huebner (1971) geht auf das Problem der minimalen Hemmstoffkonzentration ein. Nach seiner Auffassung liegt für die Penicilline die in vivo-MHK zwischen 0,1 bis 1 IE pro ml Blutplasma. Gleichzeitig verweist er aber darauf, daß eine Standardisierung eines in vivo-MHK oder MBK²⁾-Wertes fraglich und kaum durchführbar ist, da z. B. bereits in vitro breite Spannen in der Aktivität gegenüber verschiedenen Stämmen nur einer Bakterienart gegeben sind. So liegt nach seinen Angaben die in vitro-MHK für Staphylokokkus aureus in einem Bereich von 0,008 bis 2,64 IE Penicillin/ml. Müller et al. (1956) dagegen bezeichnen pauschal einen Serumspiegel von 1,0 IE/ml als bakterizid wirksam.

1) Minimale Hemmstoffkonzentration

2) Minimale bakterizide Konzentration

Aus Untersuchungen beim Rind nach intramuskulärer Injektion von Benzathin Penicillin G in therapeutischer Dosierung (ca. 12000 und 20000 IE pro kg KGW) leiten Shipper et al. (1971) ab, daß die gemessenen Konzentrationen im Serum von 0,03 bis maximal 0,067 IE/ml nicht mehr therapeutisch wirksam sind.

2.1.2. Aminoglycosid-Antibiotika

Aminoglycosidantibiotika zeichnen sich chemisch durch eine tri- bzw. tetrasaccharidartige Struktur aus. Gemeinsame Bestandteile im Aminoglycosid-Molekül sind das Streptamin (siehe Abb. 4) oder dessen Abwandlungen, wie z. B. das Desoxystreptamin (siehe Abb. 5).

Abb. 4

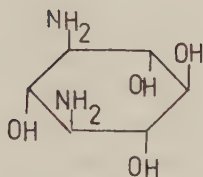
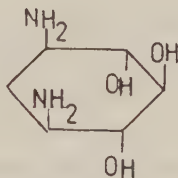


Abb. 5



Die basischen Aminoglycosidantibiotika werden meist in Form der gut wasserlöslichen Sulfate verwendet. Die Mengenangaben erfolgen stets in Gewichtseinheiten (mg/kg KGW) (Otten et al. 1975, Forth et al. 1980, Goodman Gilman et al. 1980).

Hauptvertreter der Aminoglycosidantibiotika sind das Streptomycin und das Dihydrostreptomycin, das Kanamycin,

das Neomycin, das Paromomycin, das Spectinomycin und das Gentamicin. Das Tobramycin und das Sisomicin gehören zu den sogenannten neueren Aminoglycosiden (Forth et al. 1980).

Die antimikrobielle Wirkung der Aminoglycosidantibiotika beruht auf einer Störung der Proteinsynthese der Mikroorganismen während der Proliferationsphase. Durch Bindung an Ribosomenstrukturen kommt es zu Ribonukleinsäure-Fehlinformationen und zur Hemmung von Peptid-Verknüpfungen. Für die Bildung dieser Strukturdefekte wird u.a. der Streptamin-(bzw. Desoxystreptamin-) Rest verantwortlich gemacht (Otten et al. 1975, Goodman Gilman et al. 1980).

Die Aminoglycosidantibiotika zeichnen sich durch ein breites antimikrobielles Spektrum sowohl gegen grampositive - einschließlich der Mycobacterien - als auch gegen gramnegative Mikroorganismen aus, wobei sie sich jedoch untereinander in ihrer Wirkungsintensität gegenüber bestimmten Keimen unterscheiden.

Otten et al. (1975) geben für empfindliche Keime eine in vitro-MHK zwischen 1 und 50 µg/ml an. Mit der 2 bis 10fachen MHK sollen die Aminoglycosidantibiotika eine bakterizide Wirkung aufweisen. Dies ist - je nach Keimart - teilweise mit der üblichen Dosierung zu erreichen.

Innerhalb einer Keimart treten bereits deutliche Schwankungen der MHK- bzw. MBK-Werte auf. Nach Hauschild (1973) liegen z. B. die in vitro MHK bzw. MBK-Werte von Streptomycin gegenüber Staphylokokkus aureus bei 0,1 bis 1 µg/ml, gegenüber Streptokokkus haemolyticus bei 2 bis 30 µg/ml und gegenüber E. coli bei ca. 10 µg/ml.

Speziell gegenüber Leptospiren wird von Stalheim (1970) die MHK für Dihydrostreptomycin in vivo mit 5 µg/ml und im Harn mit 2 µg/ml angegeben, sofern die Wirkspiegel lange genug aufrecht erhalten werden (hier 96 Stunden).

Aufgrund dieser Variabilität erscheint es nicht sinnvoll, Richtzahlen für den Bereich der in vivo-MHK (bzw. MBK) bei den Aminoglycosidantibiotika anzugeben.

2.1.3. Tetracycline

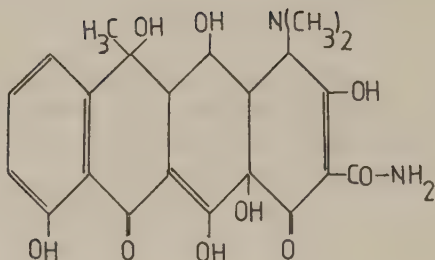
Zur Tetracyclin-Gruppe, die zur Zeit acht Verbindungen mit klinischer Bedeutung umfaßt (Otten et al. 1975, Owen 1965, Barza und Scheife 1976), zählen:

- 1) das Tetracyclin mit seinen Derivaten Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin (klassische Tetracycline);
- 2) das Rolitetracyclin und
- 3) die sog. neueren Tetracycline wie Methacyclin, Doxycyclin und Minocyclin.

Chemisch sind die Tetracycline Naphthacen-Derivate (polycyclisches Naphthacencarboxamid). Sie weisen amphotere Eigenschaften auf und bilden mit Säuren und Alkalien gut wasserlösliche Salze (Otten et al. 1975), während die kristallinen Basen nur mäßig wasserlöslich sind (Goodman Gilman et al. 1980)

Die Struktur des Oxytetracyclin ist in Abb. 6 wiedergegeben:

Abb. 6



Die Dosierung der Tetracycline erfolgt stets nach Gewichtseinheiten (mg/kg KGW).

Der Wirkungsmechanismus der Tetracycline beruht auf einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese während der Proliferationsphase. Dabei wird im wesentlichen die Bindung der Aminoacyl-t-RNA an den mRNS-Ribosomenkomplex verhindert (Forth et al. 1980, Otten et al. 1975). Da die Ribosomen der Säugetierzelle zu den Tetracyclinen eine geringere Affinität aufweisen, werden sie durch diese der Tetracyclinwirkung zugrunde liegenden Mechanismen in sehr viel geringerem Maße betroffen (Goodman Gilman et al. 1980, Otten et al. 1975). Tetracycline wirken somit zunächst bakteriostatisch. Bei hohen Wirkstoffkonzentrationen soll jedoch u. U. auch in vivo eine bakterizide Wirkung eintreten (Forth et al. 1980, Otten et al. 1975).

Die zur Gruppe der Tetracycline gehörenden Wirkstoffe besitzen ein annähernd gleiches Wirkungsspektrum. Außer gramnegativen und grampositiven Bakterien umfaßt der Wirkungsbereich auch Leptospiren, Rickettsien und Chlamydien. Zu beachten ist jedoch, daß bereits zahlreiche Stämme tetracyclin-resistent sind (Barza und Scheife 1976).

Tabelle 1a: Minimale Hemmstoffkonzentrationen (MHK) von Tetracyclin und Oxytetracyclin gegenüber verschiedenen Keimarten im in-vitro-Ansatz

Keimart	MHK (µg/ml)	Literaturangabe
E. coli-Stämme	0,07 - 2,5 0,5 - 5	Shah u. Stille (1973) Otten et al. (1975)
Klebsiella-Stämme	2,5 - 10 1,0 - 12,5	Shah u. Stille (1973) Otten et al. (1975)
Staphylokokkus aureus-Stämme	0,15 0,1 - 1,6	Shah u. Stille (1973) Otten et al. (1975)
Pseudomonas aeruginosa-Stämme	6,25 - 12,5 10 - 50	Shah u. Stille (1973) Otten et al. (1975)
Leptospiren	1 - 10	Otten et al. (1975)
Chlamydien	1 - 10	Otten et al. (1975)
Mycoplasmen	0,2 - 0,4	Otten et al. (1975)

Tabelle 1b: Minimale partielle Hemmstoffkonzentrationen (MPHK) von Tetracyclinen gegenüber verschiedenen Keimarten (Shah u. Stille 1973)

Keimart	MPHK (µg/ml) in vitro
E. coli-Stämme	0,007 - 0,04
Klebsiella-Stämme	0,02 - 0,04
Staph. aureus-Stämme	0,003 - 0,007
Pseudomonas aeruginosa-Stämme	0,195 - 1,56

Tabelle 1a gibt eine Übersicht hinsichtlich der minimalen Hemmstoffkonzentrationen gegenüber empfindlichen Keimarten. Wie daraus hervorgeht, bewegen sich die in vitro-MHK-Werte in Bereichen von ca. 0,05 bis 50 µg/ml. In weiteren Untersuchungen stellten Shah u. Stille (1973) fest, daß bei einigen Keimarten auch Tetracyclin-Konzentrationen unterhalb der in Tabelle 1a angegebenen MHK-Werte, die von den Untersuchern MPMK-Werte¹⁾ genannt wurden, ebenfalls zu einer partiellen Wachstumshemmung führen können (siehe Tab. 1b). Den Untersuchern erscheint u. a. ein synergistischer Effekt subinhibitorischer Konzentrationen mit der körpereigenen Abwehr möglich. Die Aktivität eines Antibiotikums durch die MHK zu definieren, erscheint allein unter diesem Aspekt den Autoren problematisch (Shah u. Stille 1973).

1) Minimale partielle Hemmkonzentration

2.2. Aspekte zur Bewertung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen in eßbaren Geweben und Produkten (nach Anwendung penicillin-, aminoglycosid- und tetracyclinhaltiger Tierarzneimittel)

2.2.1. Bewertung im Hinblick auf den Verbraucherschutz

2.2.1.1. Penicilline

Das im Vordergrund stehende Merkmal bei der Bewertung von Penicillinrückständen in eßbaren tierischen Produkten ergibt sich aus der offensichtlich dosisunabhängigen allergenen (sensibilisierenden) Wirkung dieser Pharmaka. Nach Forth et al. (1980) soll die Hälfte aller Arzneimittelallergien durch Penicilline verursacht werden. Nach Angaben anderer Autoren (Idsoe et al. 1969, Weingärtner 1964, Malten 1968) sollen schätzungsweise bis zu 10 % der Bevölkerung der USA penicillinempfindlich sein.

Die antigene Wirkung dieser Arzneimittelgruppe beruht auf der Fähigkeit ihrer Metabolite, stabile kovalente Bindungen mit Proteinen einzugehen (Malten 1968, Idsoe et al. 1969, Forth et al. 1980). Nach Idsoe et al. (1969) kommen verschiedene Abbauprodukte des Penicillins als potentielle Haptene in Frage: z. B. Penicillansäure, Penicilloinsäure und Penicilloylsäure. Letztere entsteht durch Öffnen des β -Lactam-Rings, und die dabei gebildete zweite Carboxylgruppe reagiert mit einem Protein.

Zur Auslösung allergischer Symptome reichen u. U. bereits kleinste Mengen, wie sie z. B. als Rückstände in der Milch oder in anderen Lebensmitteln tierischer Herkunft vorkommen können, aus (Idsoe et al. 1969, Forth et al. 1980, Weingärtner 1964, Schraudy und Rauscher 1972, Schmidt 1976, Terplan et al. 1979). Speziell dazu

berichtet Tscheuschner (1972), daß in einem Fall nach Genuß von frischem Schweinehack das Auftreten eines generalisierten Erythems wohl auf Penicillinrückstände zurückzuführen war.

Vickers et al. (1958) berichten von einer Patientin, bei der ein Ekzem auftrat, sobald sie die Milch bestimmter Kühe trank, die mehrmals mit Penicillin behandelt worden waren.

Auch der Procain-Anteil des Procain Penicillin G kann für sich allein als Allergen wirken (Otten et al. 1975, Weingärtner 1964), da es sich um ein primäres Amin in Parastellung handelt, eine Gruppierung, die in Farbstoffen und Arzneimitteln häufig vorkommt und die allergen wirksam ist.

Ein weiteres, nicht nur die Anwendung von Penicillinen, sondern generell von Antibiotika betreffendes Problem, ist die Selektion resistenter Keime. Dies gilt für das behandelte Tier und muß auch nach dem Verzehr antibiotikahaltiger Lebensmittel für den Verbraucher angenommen werden (Pichnarcik et al. 1969). Für den Konsumenten gilt allerdings einschränkend, daß zunächst nur die im Darm angesiedelte Keimpopulation als exponiert angesehen werden kann. Über die dabei bestehenden Dosiswirkungsbeziehungen liegen nur sehr wenig Untersuchungen vor, auf die in Kap. 2.2.1.3. näher eingegangen wird.

Der gegenüber Penicillinen bekannteste und häufigste Resistenzmechanismus ist die Penicillinasebildung (Penicillin- β -Lactamase) u. a. durch Staphylokokkenmutanten. Nach Forth et al. (1980) sollen 30 bis 90 % aller Staphylokokkenstämme resistent sein. Es gibt auch Lactamasen, die durch *Bac. cereus*, *E. coli*, *Aerobacter aerogenes* und *Proteus sp.* gebildet werden (Otten et al., 1975, Goodman Gilman et al. 1980)

Die Penicillinase inaktiviert Penicillin durch Spaltung des β -Lactam-Rings. Diese Resistenzentwicklung folgt dem multiple-step-Typ.¹⁾

Eine weitere, bei Penicillinen vorkommende Resistenzform ist die mutative Änderung im Zellwandaufbau ursprünglich empfindlicher Keime (Otten et al. 1975, Forth et al 1980)

2.2.1.2. Aminoglycosid-Antibiotika

Das Auftreten toxischer Wirkungen bei Anwendung der Aminoglycosidantibiotika wie neuromuskuläre Blockade, cardiovaskuläre Depression, Nephrotoxizität und Neurotoxizität, speziell die Degeneration des N. statoacusticus, ist abhängig von der Dosis, von der Zeitdauer der Exposition und der Art der Verabreichung (Clark 1977, Otten et al. 1975, Lang 1977).

Auch über das Auftreten von Allergien, allerdings nur nach lokaler und parenteraler Applikation, wird berichtet (Hauschild 1973).

Bei der Bewertung im Hinblick auf den Verbraucherschutz ist aber auch hier in erster Linie das Problem der Interaktion mit der physiologischen Darmflora und der damit verbundenen möglichen Bildung resistenter Formen zugrunde zu legen.²⁾

1) Die Resistenzentwicklung erfolgt stufenweise, wobei zur Ausprägung des Resistenzmerkmals mehrere aufeinander folgende Mutationsschritte erforderlich sind. Wird auch Penicillin-Typ der Resistenzentwicklung genannt (Otten et al. 1975).

2) Laut Gutachten des Bundesgesundheitsamtes zur Festlegung der Wartezeit von Aminoglycosid -Antibiotika

Seit Beginn der Therapie mit Aminoglycosiden sind unter grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen zahlreiche resistente Stämme entstanden; z. B. sind vormals hochempfindliche, Meningitiden verursachende Stämme von *Haemophilus influenzae* heute resistent (Goodman, Gilman et al. 1980, Otten et al. 1975). Der Mechanismus der Resistenzbildung folgt im Gegensatz zu den Penicillinen dem one-step-Typ¹⁾ (Otten et al. 1975, Forth et al. 1980), d. h. die entstandenen Mutanten haben plötzlich ihre Bindungsfähigkeit für Aminoglycosidantibiotika verloren. Daraus resultierte die Forderung, daß im Lebensmittel bei Anwendung eines empfindlichen Testverfahrens antimikrobiell wirksame Rückstandsmengen nicht mehr vorhanden sein dürfen. Diese Forderung deckt auch die o. g. dosisabhängigen toxikologischen Wirkungen ab, wobei auch zu berücksichtigen ist, daß Aminoglycosidantibiotika aus dem Intestinum nur geringgradig resorbiert werden (Lang 1977).

2.2.1.3. Tetracycline

Angaben über spezielle toxische Wirkungen von Tetracyclin-Antibiotika liegen nicht vor (Brüggemann et al. 1965, Barza und Scheife 1976, Forth et al. 1980). Auch die Sensibilisierungsquote wird im Vergleich zu den Penicillinen und Aminoglycosiden als relativ niedrig angegeben (Knothe 1968, Becker 1976). Allerdings werden im Bereich der Humantherapie auch schwerste Reaktionen wie anaphylaktischer Schock beschrieben (Becker 1976). Inwieweit Tetracycline auch nach oraler Aufnahme sensibilisierend wirken können, ist derzeit nicht näher bekannt.

1) Bereits nach einmaligem (meist 2 - 4maligem) Kontakt mit dem Therapeutikum resultieren resistente Mutanten. Der Resistenzgrad ist dabei nicht abhängig von der Arzneimittelkonzentration. Wird auch Streptomycin-Typ der Resistenzentwicklung genannt (Otten et al. 1975).

Demnach ergibt sich auch hier, daß das Problem der Resistenzbildung im Vordergrund steht. Die Zahl der tetracyclin-resistenten Varianten nahm in einem Zeitraum von fünf Jahren (1964 bis 1969) um ca. 10 bis 20 % zu. Die höchste Resistenzrate zeigt dabei *Proteus vulgaris* mit über 50 % (Otten et al. 1975, Chopra und Howe 1978).

Die Resistenzbildung folgt in der Regel dem multiple-step-Typ (siehe Seite 26) und ist in den meisten Fällen eine Folge der Übertragung von R-Faktoren, die u. U. auch bei sub-inhibitorischen Arzneimittelkonzentrationen, wie sie z. B. bei Aufnahme von Rückständen in Nahrungsmitteln gegeben sind, auftreten können (Chopra und Howe 1978).

Dies bestätigen in vitro-Untersuchungen von Lebek (1981), aus denen hervorgeht, daß noch 1/20 der MHK zu einer Selektion R-Plasmid-tragender Keime (coli K-12-Stamm, MHK 5 µg/ml) führte, die sich mit steigender Antibiotikakonzentration vergrößerte. Auch hier ist derzeit noch keine klare Aussage möglich, inwieweit aus den von Lebek (1981) durchgeführten Untersuchungen auf die in vivo-Situation beim Verbraucher nach Verzehr tetracyclinhaltiger Lebensmittel geschlossen werden kann. So haben die von Knothe (1963) bei einigen Probanden erhobenen Befunde gezeigt, daß erst bei einer Tagesdosis von 25 mg pro Erwachsener eine Selektion resistenter Keime zu beobachten war. Da jedoch davon ausgegangen werden muß, daß in diesen Untersuchungen (Knothe 1963) verschiedene heute bekannte Parameter des Resistenzgeschehens nicht erfaßt wurden und der Verlauf der Resistenzentwicklung im menschlichen Darm als ein stochastischer Prozeß anzusehen ist, wird auch hier bei der Risikobewertung davon ausgegangen, daß antimikrobiell wirksame Tetracyclinrückstände im Lebensmittel tierischer Herkunft nicht mehr vorhanden sein dürfen. Ein vorläufiger Grenzwert von 0,01 ppm, der sich aus dem "no-effect-level" (1/50 der MHK) eines empfindlichen Colistamms (MHK 0,5 µg/ml)

ergibt, wird derzeit als vertretbar angenommen.¹⁾

2.2.2. Bewertung antimikrobiell wirksamer Rückstände im Hinblick auf die Weiterverarbeitung des Lebensmittels

Bei Antibiotikarückstände enthaltenden tierischen Rohprodukten kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß bei einer auf fermentative Prozesse beruhenden Weiterverarbeitung Störungen derselben auftreten können.

Bei Verwendung von antibiotikahaltigem Fleisch bei der Herstellung von Rohwürsten kann es zur Beeinflussung der Rohwurstflora und damit zum Auftreten von Fehlfabrikaten kommen, wie Scheibner (1972) durch Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Oxytetracyclin zum Fleisch nachweisen konnte (nach der Wurstreifung wurde im wesentlichen eine atypische Keimflora nachgewiesen).

Von besonderer praktischer Bedeutung ist jedoch das Vorkommen von Hemmstoffen in der Milch. Cogan (1972) untersuchte die Wirkungen von Penicillin, Tetracyclin und Streptomycin auf verschiedene Stämme von Milchsäurebakterien und Starterkulturen. Milchsäurebakterien können durch Penicillinkonzentrationen von 0,009 bis 0,20 IE/ml gehemmt werden; die entsprechenden Werte für Tetracycline werden mit 0,09 bis 0,6 µg/ml und für Streptomycin mit 0,35 bis 13 µg/ml angegeben. Die Antibiotikamengen, die eine Hemmung der Käsestarterkulturen hervorriefen, bewegten sich ebenfalls in den genannten Konzentrationsbereichen (Cogan 1972).

1) Stellungnahme des Bundesgesundheitsamtes

Nach Kielwein (1976) tritt bereits eine Säurehemmung oder -störung ein, wenn 1 bis 3 % der Anlieferungsmilch im Kessel antibiotikahaltig sind. Auch wenn nur eine Säurehemmung vorliegt, besteht die Gefahr einer Fehlproduktion.

Nach Angaben von Schraudy und Rauscher (1972) konnten in einem Fall 8000 Liter Milch nicht zu Joghurt verarbeitet werden, da ein Teil der Anlieferungsmilch 0,3 bis 10 IE Penicillin/ml enthielt. Als molkereitechnologische Störgrenze wird von denselben Autoren ein Wert von 0,02 IE Penicillin pro ml Milch angegeben.

Nach § 2 der Milchgüteverordnung (Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch von 1980) muß von den Molkereien u. a. zweimal monatlich eine Untersuchung der Anlieferungsmilchen auf Hemmstoffe durchgeführt werden. Dazu wird der Bac. stearothermophilus-Hemmstofftest herangezogen (bzw. Brillantschwarzreduktionstest). Die Gütemerkmale, zu denen auch die Hemmstofffreiheit zu rechnen ist, sind entscheidend für die Bezahlung des Anlieferers. Bei der Feststellung von Hemmstoffen ergibt sich für diesen nach § 4 der Verordnung eine Preiskürzung von mindestens 6 Pf. pro Kilogramm während eines Monats.

2.3. Wirkstoffkonzentrationen in Blutplasma, Milch und eßbaren Geweben nach i. m.- und s. c.-Verabreichung

2.3.1. Allgemeine Angaben zur Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik stellt ein Teilgebiet der Pharmakologie dar, das sich mit den Konzentrationsverläufen von Pharmaka im Organismus befaßt (Forth et al. 1980) und das Prozesse wie Resorption, Verteilung und Elimination von Arzneimitteln beschreibt (Liedtke 1980). Unter klini-

schen Bedingungen stützt sich die Pharmakokinetik auf die in Körperflüssigkeiten nachzuweisenden Arzneimittelkonzentrationen und den daraus erstellbaren Zeit-Konzentrationskurven. Diese Zeit-Konzentrationskurven charakterisieren den zeitlichen Verlauf eines applizierten Pharmakons in einem Körperkompartiment, wie z. B. Blut oder Plasma. Der Verlauf der Zeit-Konzentrationskurve eines Stoffes steht in Beziehung zu Wirkungseintritt, Wirkungsdauer und Wirkungsintensität. Die Zeit-Konzentrationskurve wiederum ist abhängig von der Freisetzung des Wirkstoffes aus der pharmazeutischen Zubereitung, der Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion. Auch die Anreicherung in eßbaren tierischen Geweben ergibt sich unmittelbar aus diesen Vorgängen (siehe 2.3.3.).

Einige wichtige Kenngrößen, die die Pharmakokinetik eines Arzneimittels im Organismus beschreiben, sind wie folgt charakterisiert:

- 1) Eliminationshalbwertszeit (im Text nur Halbwertszeit genannt); es handelt sich um die Zeitspanne, innerhalb der im Verteilungsvolumen oder Verteilungsraum (siehe Punkt 2), die zu einem beliebigen Zeitpunkt jeweils vorhandene Konzentration der Substanz auf die Hälfte reduziert wird. Eine Bestimmung der Halbwertszeit erfolgt in der Regel in der sog. terminalen Eliminationsphase, d. h. nach Abschluß der Verteilungsprozesse.

Eliminationskonstante k_e ; sie charakterisiert den Konzentrationsabfall einer Substanz pro Zeiteinheit im Verteilungsvolumen (siehe Punkt 2).

- 2) Verteilungsvolumen; dieses stellt eine fiktive Größe dar, die das scheinbare Volumen der Verteilung im Organismus kennzeichnet. Es handelt sich um eine Proportionalitätskonstante, die die Stoffmenge im ge-

samen Organismus relativ zu derjenigen im Plasma angibt. Es errechnet sich aus dem Quotienten der applizierten Dosis und der Plasma-Anfangskonzentration (im einfachsten Fall nach i. v.-Applikation).

- 3) Verteilungskoeffizient; dieser errechnet sich aus dem Verhältnis des Verteilungsvolumens eines Stoffes zum Körpergewicht.
- 4) Kompartimente; sie stellen einen fiktiv oder reell abgegrenzten Verteilungsraum für ein Pharmakon dar, dem wiederum ein Verteilungsvolumen zugeordnet ist (z. B. Plasma). Je nach Problemstellung werden ein oder mehrere Kompartimente angenommen, die einander vor-, nach- oder parallelgeschaltet sind, wobei auch zwischen einem tiefen Kompartiment und einem zentralen Kompartiment differenziert wird.
- 5) AUC (Area Under the Curve); es handelt sich um das Integral der Blutspiegelkurve, welches identisch ist mit der Fläche, die die Wirkstoffkonzentration-Zeit-Kurve in den Grenzen Null bis Unendlich einschließt. Es ist ein Maß für die insgesamt absorbierte und irreversibel eliminierte Menge eines Arzneimittels.
(Liedtke 1980)

2.3.2. Besondere Abhängigkeiten in bezug zur Resorption und Darreichungsform des Arzneimittels

Die älteste und wohl auch verbreitetste Art der Anwendung von Arzneimitteln - zumindest im Hinblick auf systemische Wirkungen - ist die orale Verabreichung (Schou 1961). Dies gilt auch für den Bereich der Veterinärmedizin, obwohl

hier aufgrund der spezifischen Gegebenheiten der parenteralen Applikation eine sehr viel größere Bedeutung als in der Humanmedizin zuerkannt werden muß (Brummer 1967). Dies gilt insbesondere für die intramuskuläre und subkutane Verabreichung, auf die im folgenden im Hinblick auf die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Fragestellung eingegangen werden soll.

Die erste subkutane Applikation, die in der Literatur erwähnt wird, wurde 1853 von dem Arzt Alexander Wood aus Edinburgh verabreicht.

Die Ärzte benutzten diese neuen Applikationsformen zunächst zur örtlichen Behandlung von Neuralgien; bald jedoch wurde die systemische Wirkung intramuskulär und subkutan verabreichter Pharmaka entdeckt (Shou 1961).

Ein subkutan oder intramuskulär verabreichtes Pharmakon, das also nicht direkt in Blut- (oder Lymph-)gefäße eingebracht wird, muß aus seinem Gewebedepot resorbiert werden und gelangt somit mit Verzögerung in die Blutbahn (Hauschild 1973). Dabei stellt sich die Frage, von welchen Faktoren diese Resorption beeinflußt wird und abhängt ist. Nach Hauschild (1973) sind dies:

- a) Art und Ort der Applikation,
- b) chemisch-physikalische Eigenschaften des verabreichten Stoffes,
- c) Zustand des Organismus.

Zu a): Art und Ort der Applikation

Die Durchblutung am Ort der Verabreichung stellt ein entscheidendes Kriterium für die Resorption eines Pharmakon nach intramuskulärer und subkutaner Injektion dar (Shou 1961). Durch verschiedene, bereits vor Jahren durchgeführte Versuche (Shou 1961, Stone und Miller 1949) konnte die Annahme bestätigt werden, daß die Aufnahme eines in das Gewebe applizierten Stoffes in die Blutbahn vor allem über die Kapillaren stattfindet. Nur hochmolekulare

Stoffe sollen über die Lymphgefäße aufgenommen werden (Hauschild 1973, Wepf 1948, Stone und Miller 1949).

Für die Resorption nach i. m.-Verabreichung ist zunächst von Bedeutung, daß die Skelettmuskulatur in Übereinstimmung mit ihrem intensiven Stoffwechsel eine sehr gute Blutversorgung aufweist (Bucher 1973). Die zahlreichen Kapillaren bilden mit ihren Anastomosen ein enges Maschenetz, wobei jeder Muskelfaser mehrere der kleinen Gefäße anliegen. Zwischen den quergestreiften Muskelfasern liegt ein lockeres Bindegewebe, das wiederum mit zahlreichen Kapillaren durchsetzt ist. Die Fetteinlagerungen sind je nach Muskelpartie sehr unterschiedlich und abhängig vom Geschlecht und Ernährungszustand des Individuums.

Die große Anzahl der Kapillaren in der Muskulatur hat zur Folge, daß der Diffusionsweg eines Stoffes zu diesen im Mittel geringer ist als z. B. zu kleinen Venen und Lymphgefäßen und die Gesamtfläche, die zur Aufnahme in die Blutbahn zur Verfügung steht, relativ groß ist (Shou 1961).

Geht man davon aus, daß der Stoff allein durch Diffusion in die Gefäße übergeht, hängt die Geschwindigkeit der Resorption u. a. vom Konzentrationsgradienten zwischen dem Depot und dem Gefäß ab (Forth et al. 1980, Pappenheimer 1953).

Die Menge des Stoffes, die eine bestimmte biologische Membran durchdringt, wird durch das Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben. Dies besagt auch: je schneller der Stoff durch die Kapillaren abtransportiert wird, desto höher ist der Konzentrationsgradient (Pappenheimer 1953).

Zur Verabreichungsweise ist zu sagen, daß eine unter Druck verabreichte Substanz nur sehr langsam aus ihrem Depot resorbiert wird. Der Grund dafür liegt in der

Beeinträchtigung der Blutzirkulation (Zusammenpressen der Gefäße) (Barke 1943).

Evans et al. (1974) untersuchten anhand von Tracer-Studien die Durchblutung verschiedener Muskelgruppen und die damit verbundene Arzneimittelresorption beim Menschen. Wird in einen aufgrund höherer Fettanteile schlechter durchbluteten Muskel (z. B. M. glutaeus) appliziert, ist mit einer verzögerten Resorption des Stoffes zu rechnen. Die Durchblutung des M. deltoideus war, wie die Untersucher feststellen konnten, signifikant größer und damit auch die Arzneimittelresorption.

Auch Schwartz et al. (1974) konnten nach Applikation von Lidocain in den M. deltoideus beim Menschen einen raschen Anstieg der Wirkstoffkonzentrationen im Serum nachweisen als nach Applikation in den M. vastus lateralis.

Groothuis und Werdler (1980) führten Untersuchungen an Zwergziegen durch, die zu dem Ergebnis führten, daß eine Applikation in die Nackenmuskulatur signifikant höhere Wirkstoffspiegel im Blut ergab als nach Verabreichung in die Hinterhandmuskulatur. Die Autoren führten die offensichtlich bessere Resorption ebenfalls auf die bessere Durchblutung der Nackenmuskulatur zurück.

Evans et al. (1974) stellten weiterhin fest, daß die Körperseite keine Rolle in bezug auf die Resorption eines Stoffes spielt.

Subkutan wird ein Arzneimittel vor allem dann verabreicht, wenn mögliche Unverträglichkeitserscheinungen, die bei Applikation in die Muskulatur auftreten können, vermieden werden sollen; dies kann z. B. bei Arzneimitteln auftreten, die Aluminiumstearat enthalten oder an Makromoleküle gekoppelt sind (Hauschild 1973).

Die Injektion erfolgt dabei in das Unterhautgewebe, das zur Befestigung der Haut auf ihrer Unterlage, z. B. einer Muskelfascie, dient (Bucher 1973). Es besteht z. B. im Bereich des Halses aus lockerem, lamellär gebautem Bindegewebe, das z. T. mit kollagenen Fasersträngen und verschieden stark ausgebildetem Fettgewebe durchsetzt ist. In der Grenzschrift zwischen Corium und Subcutis liegt ein weitmaschiges, aus Arterien und Venen bestehendes Gefäßnetz. Das subkutane Fettgewebe ist relativ gut mit Kapillaren durchsetzt (Bucher 1973).

Speziell beim Rind bietet sich für die s. c.-Applikation der Bereich des Triels an, insbesondere, wenn größere Volumina verabreicht werden müssen. Im Unterhautgewebe des Triels befindet sich eine charakteristische Fettgewebsansammlung, wobei sich jedoch in Abhängigkeit von Alter, Ernährungszustand sowie Haltung des Tieres Unterschiede in der Beschaffenheit derselben ergeben können. Während bei Jungtieren das Gewebe in diesem Bereich locker und leicht verschiebbar und relativ gut durchblutet ist, kommt es bei älteren Tieren, insbesondere, wenn diese längere Zeit im Kurzstand gehalten wurden, durch Aufstützen an der Krippe oder mechanische Beanspruchung durch die Anbindevorrichtung zur Bildung von retikulärem Bindegewebe. Es entsteht letztlich ein derber Knoten, der nur wenig Blutgefäße aufweist und auf dem die Haut relativ unverschieblich aufsitzt (Bergsjö 1976). Bereits bei einer als physiologisch zu beurteilenden Situation ist davon auszugehen, daß aufgrund der Art der Durchblutung und entsprechend dem Fickschen Diffusionsgesetz ein subkutanes Depot langsamer abgebaut wird als ein intramuskuläres. Bei den oben angesprochenen Veränderungen im Bereich des Triels ist mit einer noch stärkeren Resorptionsverzögerung zu rechnen.

Zu b): chemisch-physikalische Eigenschaften des verabreichten Stoffes

Stoffe, die wasser- oder lipidlöslich sind, werden nach allgemeiner Auffassung schneller resorbiert als Stoffe, die z. B. in Form von Suspensionen appliziert werden (Hauschild 1973). Nach Shou (1961) und Hauschild (1973) können gerade lipidlösliche Verbindungen schneller resorbiert werden als wasserlösliche, da man annimmt, daß diese Membranen und Zellverbände passieren können, indem sie sich in den dort vorhandenen Lipiden lösen (siehe 2.3.1.). Schwer und unlösliche Stoffe werden, falls sie nicht bei der Resorption in lösliche Verbindungen überführt werden, in Form kleinster Teilchen bzw. als Moleküle in die Blutbahn aufgenommen (Hauschild 1973). Die Geschwindigkeit des Durchtritts durch die Kapillarmembran nimmt jedoch mit steigender Teilchen- bzw. Molekülgröße ab (Pappenheimer 1953).

Sofern aufgrund der chemisch-physikalischen Eigenschaften eines Stoffes sowie der gegebenen Durchblutungsverhältnisse mit einer unerwünschten Initialwirkung, gefolgt von einer Phase therapeutisch bereits unwirksamer Wirkstoffkonzentrationen, gerechnet werden muß, kann dies durch eine entsprechende Derivatisierung des Wirkstoffes zu schwer löslichen Verbindungen (z. B. Bildung des Procain- bzw. Benzathin-Salzes des Penicillin G) verhindert werden, insbesondere, wenn diese in Form von öligen Emulsionen oder Wachsen verabreicht werden (Gratzl und Jaksch 1952). Auch die Verwendung von Makromolekülverbindungen, von Implantaten bzw. die gleichzeitige Injektion gefäßverengender Mittel (z. B. Adrenalin) kann zu einem solchen Effekt führen (Forth et al. 1980, Hauschild 1973). Die sich daraus ergebenden Unterschiede in den Konzentrationen der o. g. Penicilline im Serum und die sich ergebenden Rückstände in Muskulatur und Organen sind unter 2.3.3.1.1. und 2.3.3.1.3. dargelegt. Pharmaka, die dagegen in einfacher öli-ger Lösung intramuskulär appliziert werden, können relativ schnell aus ihrem Lösungsmittel

resorbiert werden, während dieses selbst nur sehr langsam abgebaut wird (Hauschild 1973).

Zu c): Zustand des Organismus

Nach experimentell induziertem Fieber konnten Groothuis und Werdler (1980) bei Zwergziegen eine vergleichsweise verminderte Resorption eines in die Nackenmuskulatur injizierten Wirkstoffes feststellen. Eine Resorptionsverbesserung kam jedoch wieder zustande, sobald mit dem Fieber auch Muskelzittern auftrat. Daraus schließen die Untersucher, daß bei kranken Tieren bereits die Resorption vom Ort der Applikation beeinflußt sein kann. Unabhängig von den übrigen Stoffwechselfparametern wie z. B. Leber- und Nierenfunktion, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, ist diese Tatsache beim Vergleich der Pharmakokinetik von Arzneimitteln bei gesunden und kranken Tieren zu beachten.

Auch über histopathologische Veränderungen (z. B. Abkapselung) und eine dadurch bedingte verzögerte Resorption vom Ort der Applikation wird berichtet (Rasmussen und Høgh 1971).

Somit ergibt sich, daß aufgrund der Beschaffenheit des Applikationsortes, der Art des verwendeten Arzneimittels, des Gesundheitszustands der Tiere sowie möglicher Abgrenzungsreaktionen mit einer besonderen Problematik hinsichtlich des Vorkommens von Arzneimittelrückständen an der Injektionsstelle zu rechnen ist.

2.3.3. Ergebnisse spezieller Untersuchungen

2.3.3.1. Penicilline

2.3.3.1.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma

Die Alkalisalze des Penicillin G sind gut wasserlöslich und werden nach parenteraler Gabe rasch resorbiert, verteilt und ausgeschieden (Otten et al. 1975, English 1965).

Die beiden Depotpenicilline Procain Penicillin G und Benzathin Penicillin G zeichnen sich durch eine im Vergleich zu den Alkalisalzen des Penicillin G wesentlich geringere Wasserlöslichkeit aus. So ist nach Otten et al. (1975) das Procain-Salz bei 20° C mit 0,5 %, das Benzathin-Salz mit nur 0,035 % wasserlöslich.

Diese geringere Wasserlöslichkeit bedingt nach parenteraler Verabreichung (i. m., s. c.) eine langsame Resorption vom Applikationsort (siehe Kapitel 2.3.2.), wodurch - in Abhängigkeit von der Dosis - nachweisbare Konzentrationen im Plasma u. U. über Tage erhalten bleiben können. Gleichzeitig kann jedoch auch davon ausgegangen werden, daß die maximalen Wirkstoffkonzentrationen wesentlich niedriger liegen als die Spitzenwerte nach Verabreichung der Alkalisalze (Forth et al. 1980, Otten et al. 1975, Shipper et al. 1971).

Die Pharmakokinetik des leicht wasserlöslichen Na-Ampicillin (20 %ige wäßrige Lösungen sind herstellbar) (Otten et al. 1975) entspricht weitgehend der der Alkalisalze des Penicillin G, unterscheidet sich jedoch wesentlich hinsichtlich Resorption und Elimination vom schwerer wasserlöslichen, aber ebenso häufig angewandten Ampicillin-

Trihydrat. Otten et al. (1975) geben für die Alkalisalze der Penicilline eine Halbwertszeit von 0,5 bis maximal 1 Stunde nach intramuskulärer Verabreichung an; Ziv et al. (1973) geben aufgrund ihrer Untersuchungen bei Kühen und Schafen für Penicillin G-Na (nach i. v.-Verabreichung des Wirkstoffes) eine Halbwertszeit von 0,3 ($\pm$ 0,04) Stunden an, wobei ein 2-Kompartimentmodell den Berechnungen zugrunde gelegt wurde. Das Verteilungsvolumen wird mit $53,1 \pm 4,6$ Litern angegeben.

Weitere umfangreiche Untersuchungen beim Rind wurden von Nouws und Ziv (1978b) durchgeführt. Unter Zugrundelegung eines 2-Kompartimentmodells wurde nach intramuskulärer Verabreichung für Penicillin G-Na eine Halbwertszeit von 1,32 Stunden berechnet, während für Procain Penicillin G eine solche von ca. 4 bis 5 Stunden angegeben wird. Für das Ampicillin-Na betrug die Halbwertszeit 1,35 Stunden und ist somit der des Penicillin G-Na vergleichbar, während für das Ampicillin-Trihydrat eine Halbwertszeit von 12,06 Stunden nachgewiesen werden konnte (Nouws und Ziv 1978b). Die Untersuchungen von Ziv et al. (1973) bei Rind und Schaf ergaben für das Ampicillin-Na eine Halbwertszeit von 0,5 ($\pm$ 0,05) Stunden. Das Verteilungsvolumen beim Rind betrug in diesem Falle $94,8 \pm 10,5$ Liter. Es handelte sich ausschließlich um wässrige Zubereitungen.

Ebenso konnten Galtier und Charpentreau (1979) beim Schwein für Ampicillin-Na nach intravenöser und intramuskulärer Applikation von je 20 mg/kg KGW Halbwertszeiten von 0,67 und 1,18 Stunden bestimmen. Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Penicillin G-Na und Ampicillin-Na beim Pferd ergaben Halbwertszeiten von 0,88 bzw. 1,55 Stunden (Dürr 1976). Dies entspricht weitgehend den bei anderen Tierarten gemessenen Werten. Dagegen ist der ermittelte Verteilungskoeffizient von ca. 2,5 Litern/kg beim Pferd deutlich höher (Dürr 1976). Je nach Dosierung der Alkalisalze bleiben beim Menschen Serumspiegel um 0,2 IE/ml und höher über 3 bis 6 Stunden erhalten (Otten

et al. 1975). Gratzl und Jaksch (1952) berichten über Untersuchungen beim Hund, wo eine intramuskuläre Injektion von 5000 IE Penicillin G-Na/kg KGW in wäßriger Lösung zunächst zu Anfangswerten zwischen 16 bis maximal 40 IE/ml Serum führte; nach 5 Stunden hatten die Wirkstoffkonzentrationen jedoch bereits die untere Grenze des Nachweisverfahrens von 0,02 IE/ml unterschritten. Auch Siddique et al. (1968) kamen bei Untersuchungen am Hund zu ähnlichen Ergebnissen.

Bei lebensmittelliefernden Tieren (Rind, Schaf, Schwein) ergibt sich nach Verabreichung von Penicillin G-Na und -K ein ähnliches Bild über den Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im peripheren Plasma. Nach i. m.-Verabreichung von ca. 27000 IE Penicillin G-Na in wäßriger Zubereitung/kg KGW an Rinder fielen die Wirkstoffkonzentrationen innerhalb eines Zeitraums von 72 Stunden auf bzw. unter die Nachweisgrenze des Verfahrens von 0,006 IE/ml Serum ab; 8 Stunden nach der Applikation konnten dagegen noch Werte um 0,6 bis 0,7 IE/ml Serum nachgewiesen werden (Shipper et al. 1971).

Welsh et al. (1948), die in ihren Untersuchungen an Rindern eine vergleichbare Dosis Penicillin G-Na (in wäßriger Lösung) subkutan verabreichten, wiesen zunächst relativ hohe Anfangswerte um 8 IE/ml Serum nach, die nach 5 Stunden bereits auf 0,5 IE/ml abgesunken waren. Die untere Grenze der Nachweisbarkeit der analytischen Methode von 0,05 IE/ml war nach insgesamt 36 bis 48 Stunden erreicht. Nach Verabreichung niedriger Dosen (10000 bis 16000 IE/kg KGW) konnten schon nach 8 Stunden nur noch Werte um 0,1 IE/ml gemessen werden.

Beim Schwein wurden nach intramuskulärer Verabreichung von 5000 IE Penicillin-G-K in ölgiger Suspension/kg KGW Anfangswerte bis zu 3,5 IE/ml Serum gemessen; die Wirk-

stoffkonzentrationen lagen jedoch lediglich innerhalb eines Zeitraums von ca. 1 Stunde über 1,0 IE/ml. Nach 5 bis 6 Stunden waren sie auf Werte kleiner als 0,2 IE/ml abgesunken; dieselbe Dosis in wäßriger Lösung ergab maximale Wirkstoffkonzentrationen von 2 IE/ml (Müller et al. 1956).

Die wenigen mit Na-Ampicillin durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, daß nach intramuskulärer Verabreichung von 10 mg/kg KGW beim Rind nach 0,85 Stunden Maximalspiegel im Serum von 8,88 µg/ml nachzuweisen waren (Nouws und Ziv 1978b).

Im Gegensatz zu den Alkalisalzen des Penicillin G ergeben sich für das Procain- und das Benzathin-Salz über einen sehr viel längeren Zeitraum nachweisbare Wirkstoffkonzentrationen im Serum. So konnten Gratzl und Jaksch (1952) beim Rind nach intramuskulärer Verabreichung der relativ geringen Dosis von 1000 und 2000 IE Procain Penicillin G/kg KGW (wäßrige Zubereitung) über einen Zeitraum von 24 bis 30 Stunden Wirkstoffe im Serum nachweisen.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Shipper et al (1971), die ebenfalls beim Rind nach einmaliger intramuskulärer Verabreichung von 10000 bzw. 16000 IE Procain Penicillin G (wäßrige Zubereitung)/kg KGW den Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Serum über 40 bis 72 Stunden erfassen konnten. Maximale Wirkstoffkonzentrationen von ca. 0,4 IE/ml, die damit deutlich unterhalb der nach Verabreichung der Alkalisalze lagen, wurden dabei nach 4 bis 8 Stunden erreicht. Die intramuskuläre Verabreichung derselben Dosis Benzathin Penicillin G (ebenfalls in wäßriger Zubereitung) resultierte dagegen in einem relativ konstanten Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Serum in einem Bereich von 0,02 bis 0,04 IE/ml über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden (danach erfolgten keine Messungen mehr).

Hollister et al. (1955) konnten bei Rindern nach Gabe von 4 Millionen Einheiten von Benzathin- und Procain-Penicillin G in Sesamöl mit 2 % Aluminium-Stearat Konzentrationen im Serum um 0,01 IE/ml bis maximal 216 Stunden post appl. nachweisen.

Untersuchungen beim Pferd (6 Tiere) zeigen vergleichbare Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse. Eine einmalige intramuskuläre Dosis von 22000 IE Procain Penicillin G/kg KGW (wäßrige Zubereitung) führte zu Maximalwerten von 1,42 IE/ml Serum 3 Stunden nach der Verabreichung. Konzentrationen von 0,08 IE/ml waren noch nach 48 Stunden nachzuweisen (Stover et al. 1981).

Annähernd dieselben Ergebnisse erhielten Doll et al. bereits 1950, die an insgesamt 28 Fohlen und Stuten Procain Penicillin G in wäßriger Suspension in einer Dosierung von 20000 bzw. 14000 IE/kg KGW intramuskulär verabreichten. Bei den Fohlen wurden Höchstwerte im Serum von bis zu 1,28 IE/ml nach 1 Stunde, aber z. T. auch erst nach 12 Stunden gemessen. Nach 48 und auch z. T. noch nach 72 Stunden lagen die Werte im Serum bei 0,04 bis 0,08 IE/ml.

Mercer et al. (1971a) konnten beim Schwein nach einer einmaligen intramuskulären Verabreichung von 21000 IE Procain Penicillin G/kg KGW in wäßriger Suspension eine mittlere Wirkstoffkonzentration im Serum von 7,65 IE/ml nach 2 Stunden nachweisen. Nach 24 Stunden waren die Wirkstoffspiegel auf 0,05 IE/ml Serum abgesunken. Weitere Messungen wurden nicht durchgeführt.

Auch für das Ampicillin-Trihydrat konnte gezeigt werden, daß die im Blut erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen nach intramuskulärer Verabreichung von 12,5 mg/kg KGW mit 2,4 µg/ml deutlich unterhalb der nach Behandlung mit Ampicillin-Na (s. o.) liegen (bei fast derselben Do-

sierung). Dagegen ergaben sich offensichtlich keine Unterschiede hinsichtlich des Zeitpunkts des Auftretens der Höchstwerte (1,3 Stunden post appl.). Beide Arzneimittel lagen in wäßriger Zubereitung vor (Nouws und Ziv 1978 b).

2.3.3.1.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch

Nach Otten et al. (1975) werden etwa 5 bis 10 % der im Serum nachweisbaren Konzentrationen in der Milch gemessen. Blobel und Burch (1960) konnten beim Vergleich der Konzentrationsverläufe bei Ziegen und Kühen in der Milch Hemmstoffe feststellen, die etwa 5 bis 20 % der Werte im Serum entsprachen. Beim Vergleich des Verlaufs der Wirkstoffkonzentrationen in der Milch nach parenteraler Applikation von Penicillin G-Na, Procain- und Benzathin-Penicillin G zeigten sich deutliche Parallelen zum Verlauf der Konzentrationen im Serum. So konnte Shipper (1965) nach einer intramuskulären Injektion von 9 Millionen IE Penicillin G-Na (in wäßriger Lösung)/Tier in der Milch nach 2 bis 4 Stunden Arzneimittelkonzentrationen um 0,14 IE/ml nachweisen, die jedoch spätestens nach 48 Stunden auf die Nachweisgrenze von 0,001 IE/ml abgesunken waren.

Dieselbe Dosis Procain Penicillin G ergab die höchsten Konzentrationen von 0,12 IE/ml 8 Stunden post appl., die erst nach 48 Stunden auf Werte um 0,004 IE/ml abgefallen waren. Die Konzentrationen des Benzathin Penicillin G bewegten sich bis 72 Stunden nach der Verabreichung überwiegend im Bereich der Nachweisgrenze des Verfahrens (nur in einem Fall konnten noch 0,04 IE/ml nach 2 und 4 Stunden nachgewiesen werden) (Shipper 1965).

Angaben über das Rückstandsverhalten in der Milch nach Verabreichung einer Kombination aus Procain- und Benzathin Penicillin G (in wäßriger Suspension) (9000 IE/kg KGW) macht Prouty (1961); die höchsten Werte in der Milch lagen bei 0,038 IE/ml und wurden nach 12 Stunden gemessen (1. Melkzeit post appl.). Innerhalb von 48 Stunden war die Nachweisgrenze von 0,005 IE/ml wieder erreicht.

Wright und Harold (1960) verabreichten Na- und Procain-Penicillin G (in wäßriger Zubereitung) in Dosierungen von jeweils 11000 und 22000 IE/kg KGW an Kühe. Die erreichten Höchstwerte für beide Arzneimittel lagen in einem Bereich von 0,1 bis 0,15 IE/ml Milch. Während antimikrobiell wirksame Rückstände nach Verabreichung von Procain Penicillin G über 3 Tage in der Milch nachweisbar waren, waren diese nach Behandlung mit Penicillin G-Na jedoch bereits 48 Stunden post appl. unter die Nachweisgrenze des Verfahrens (0,001 IE/ml) abgefallen. Wagenseil (1967), der die Ausscheidungszeiten von wäßrigem Na- und Procain Penicillin G in der Milch nach intramuskulärer Applikation der sehr hohen Dosis von 30 Millionen Einheiten pro Tier verglich, kommt zu ähnlichen Eliminationszeiten. Penicillin G-Na war bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar (Nachweisgrenze 0,01 IE/ml), wobei Maximalwerte von 1,8 IE/ml bereits nach 4 Stunden erreicht wurden; erwartungsgemäß lagen die höchsten Konzentrationen nach Behandlung

mit Procain Penicillin G deutlich niedriger (um 0,7 IE/ml), während insgesamt ein Wirkstoffnachweis bis zu 48 Stunden post appl. möglich war. Hingegen waren Rückstände nach Anwendung eines Benzathin Penicillin G enthaltenden Präparates bis über 10 Tage in der Milch nachweisbar; die gemessenen Konzentrationen lagen jedoch nie höher als 0,032 IE/ml (Wright und Harold 1960).

Untersuchungen zum Übergang von wässrigem Penicillin G-Na vom Serum in die Milch wurden von Ziv et al. (1974) an Schafen durchgeführt. Nach einer intramuskulären Injektion von 20 mg/kg (= 32000 IE/kg KGW) wurden 6 Stunden post appl. in der Milch die höchsten Wirkstoffkonzentrationen von 0,3 IE/ml nachgewiesen. Im Serum waren zu diesem Zeitpunkt Wirkstoffkonzentrationen um 0,2 IE/ml festzustellen (die höchsten Konzentrationen im Serum von 10 IE/ml waren dort bereits 1 Stunde nach der Verabreichung gemessen worden). Es konnten danach bis zum Abfall der Wirkstoffkonzentrationen auf 0,01 IE/ml (56 Stunden post appl.) in beiden Körperflüssigkeiten etwa gleich hohe Werte nachgewiesen werden.

Aus den Untersuchungen von Cannon und Hawkins (1962) geht hervor, in welchem Umfang die Nachweisbarkeit von antimikrobiell wirksamen Rückständen nach Verabreichung öligere Zubereitungen mit Aluminiumstearatzusatz verlängert wird. So war bei einer Nachweisgrenze von 0,0063 IE/ml ein Wirkstoffnachweis nach i. m.-Verabreichung (7000 IE/kg KGW) von Procain Penicillin G in Sesamöl mit Zusatz von Aluminiumstearat noch nach 96 Stunden möglich, wobei 24 Stunden post appl. die maximale Wirkstoffkonzentration mit 0,036 IE/ml Milch ermittelt wurde.

2.3.3.1.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben

Penicilline werden nach parenteraler Applikation vorwiegend renal ausgeschieden (Barza 1976, Forth et al. 1980, Otten et al. 1975, Clark 1976). Mit einer besonderen Rückstandsbildung in der Niere ist daher zu rechnen. Ansonsten kann bei den Alkalisalzen jedoch davon ausgegangen werden, daß aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit, der Eliminationshalbwertszeit von ca. 1 Stunde sowie dem bekannten Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Blut nach i. m.- und s. c.-Injektion (siehe 2.3.3.1.1.) - eine reaktionslose Verabreichung vorausgesetzt - nicht mit einer besonderen Depotbildung am Ort der Applikation sowie sonstigen Rückstandsanreicherungen zu rechnen ist. Diese Annahme ist nicht auf die sog. Langzeitpenicilline (Procain- und Benzathin-Penicillin G) übertragbar, wie auch die wenigen bisher dazu experimentell erhobenen Befunde gezeigt haben.

Nouws und Ziv (1978b) verglichen die Quotienten der Konzentrationen verschiedener β -Lactam-Antibiotika in Serum und Organen beim Rind nach intramuskulärer Verabreichung, wobei die Dosierungen zwischen 6,5 und 12,5 IE bzw. $\mu\text{g/kg}$ KGW lagen. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Wirkstoffkonzentrationen in der Muskulatur bei allen untersuchten Penicillinen zwar im Mittel niedriger liegen als im Serum, die Höhe der angegebenen Standardabweichungen zeigt jedoch, daß dies im Einzelfall auch umgekehrt sein kann. Dagegen werden in der Nierenrinde stets höhere Wirkstoffkonzentrationen als im Serum gemessen (Verhältniswerte 2,1 bis 9,3).

Weitere Rückstandsuntersuchungen bei Schaf, Schwein und Kaninchen wurden von Geißler (1956) durchgeführt. Nach einer i. m.-Verabreichung von 25000 IE Penicillin G/

Tabelle 2: Quotienten der Konzentrationen verschiedener Penicilline im Serum und in einigen Organen nach intramuskulärer Verabreichung an Rinder ($\bar{x} \pm SD$) (Nouws und Ziv 1978 b)

Antibio- tikum	Zeitpunkt post appl. (h)	Nierenrinde/ Serum	Muskelpreß- saft/Serum	Nierenrinde/ Muskelpreß- saft
Na-Pen.G	3	2,1 $\pm$ 1,0	0,91 $\pm$ 0,42	2,7 $\pm$ 1,1
Proc.Pen.G	2 1/2	4,6 $\pm$ 2,0	0,44 $\pm$ 0,21	10,7 $\pm$ 0,5
Proc.Pen.G	7	4,3 $\pm$ 1,0	0,77 $\pm$ 0,93	14,3 $\pm$ 11,4
Proc.Pen.G	17	5,2 $\pm$ 1,7	0,75 $\pm$ 0,26	7,1 $\pm$ 2,1
Proc.Pen.G	36	9,3 $\pm$ 4,1	0,66 $\pm$ 0,50	22,3 $\pm$ 1,7
Proc.Pen.G	22 1/2	6,9 $\pm$ 1,9	0,51 $\pm$ 0,65	31,3 $\pm$ 27,8
Ampicillin- Na	7	6,7 $\pm$ 1,8	0,73 $\pm$ 0,77	16,2 $\pm$ 10,8
Ampicillin- Trihydrat	66	5,7 $\pm$ 2,7	0,54 $\pm$ 0,17	10,6 $\pm$ 4,5

Tabelle 3: Antimikrobiell wirksame Rückstände in Plasma und verschiedenen Organen nach i. v.-Verabreichung von wäßrigem Ampicillin-Na an Schweine
(Galtier und Charpentreau 1979)

Gewebe	Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$ bzw. g) zwischen 10 bis 240 Minuten nach der Behandlung (Mittelwerte)			
	10 Min.	30 Min.	120 Min.	240 Min.
Plasma	55,2	17,7	3,19	0,97
Nieren	422,3	66,1	24,60	9,93
Leber	106,3	69,6	5,64	3,37
Muskel	5,67	4,45	-	1,28

kg KGW in wäßriger Lösung konnten jedoch nur bis zur 7. Stunde nach der Behandlung Wirkstoffkonzentrationen in der Niere nachgewiesen werden (bis ca. 1,7 IE/g), wobei die Nachweisgrenze des angewandten Verfahrens bei 0,1 IE/g Gewebe lag. Die gleichen Untersuchungen zeigten, daß antimikrobiell wirksame Rückstände bis zur 13. Stunde nach Verabreichung in der Niere nachweisbar waren (bis 3 IE/g), wenn das Arzneimittel in einer öligen Suspension unter Zusatz von 2 % Bienenwachs verabreicht wurde. Der Wirkstoffnachweis gelang bis zur 31. Stunde post appl., wenn das Arzneimittel (Procain Penicillin G) in Öl mit Zusatz von 1 % Aluminiumstearat verabreicht wurde. Unter diesen Bedingungen konnten zu diesem Zeitpunkt sogar in der Bauchmuskulatur noch Werte um 0,1 IE/g festgestellt werden.

Nach intramuskulärer Verabreichung von 9000 IE Procain Penicillin G/kg KGW (ohne Angaben zur Art der Zubereitung) an Schweine fand Schmidt (1976) in Leber, Muskulatur und Fett bis maximal 24 Stunden post appl. Rückstände im Bereich von 0,01 bis 0,04 IE/g. Die Niere enthielt hingegen bis zur 72. Stunde nach der Behandlung Hemmstoffe in den o. g. Konzentrationsbereichen.

Auch Looftsgard et al. (1969) führten Untersuchungen beim Schwein durch. Sie konnten nach einer intramuskulären Injektion von 12000 IE Procain Penicillin G/kg KGW (ohne Angaben zur Art der Zubereitung) bis zu 3 Tagen in Leber und Muskulatur Arzneimittelrückstände nachweisen, die allerdings immer unter 0,1 IE/g lagen, während die Niere noch nach 4 Tagen Hemmstoffe im Bereich von 0,002 IE/g enthielt (Nachweisgrenze 0,001 bis 0,0024 IE/g). Nach einer Injektion von 8000 IE Benzathin Penicillin G/kg KGW (ohne Angaben zur Zubereitung) dagegen wurden in den genannten Organen bis zu 7 Tagen und in der Niere bis über 11 Tage Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen,

bei einer Dosierung von 12000 IE/kg KGW sogar bis zu 14 Tagen. Die Rückstandskonzentrationen überstiegen dabei nie den Wert von 1,0 IE/g. Sie lagen bei 0,002 - 0,1 IE/g.

Galtier und Charpentreau (1979) konnten beim Schwein nach i. v.-Verabreichung von 20 mg Ampicillin-Na/kg KGW die in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen im Plasma und verschiedenen Organen nachweisen. Daraus geht hervor, daß auch hier in der Niere die höchsten Wirkstoffkonzentrationen zu erwarten sind. Ebenso wurden in der Leber deutlich höhere Konzentrationen als in Muskulatur und Plasma gemessen.

Eine besondere Rolle, u. a. im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ist den an der Injektionsstelle verbleibenden Rückständen beizumessen. Dazu berichten Rasmussen und Høgh (1971), daß nach Verabreichung therapeutischer Dosen verschiedener im Handel befindlicher, penicillin-, streptomycin- und tetracyclinhaltiger Arzneimittel an Rinder und Schweine die Muskulatur im Bereich der Injektionsstelle zum Zeitpunkt der Schlachtung (6 Tage nach Behandlung) erhebliche Rückstandskonzentrationen aufwies, während in der übrigen Muskulatur sowie in den Organen Rückstände nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Die im Bereich der Injektionsstelle gemessenen Penicillinkonzentrationen lagen zwischen 0,1 IE/g und über 200 IE/g. Die höchsten Werte ergaben sich dabei für ein Arzneimittel, das Procain Penicillin G (in Kombination mit Dihydrostreptomycin) in wäßriger Zubereitung enthielt (verabreichte Dosis: 10000 IE Penicillin/kg KGW), während nach Anwendung von Procain- und Benzathin Penicillin G (wäßrige Zubereitung, 15000 IE/kg KGW) lediglich Wirkstoffkonzentrationen im Bereich von 8,6 IE/g nachgewiesen werden konnten.

Auch Mercer et al. (1971b) befaßten sich mit dem Problem des Verbleibs von Rückständen an der Injektionsstelle.

Sie konnten feststellen, daß nach Verabreichung eines Kombinationspräparates (Procain- und Benzathin-Penicillin G sowie Dihydrostreptomycin in wäßriger Zubereitung; Dosis 8800 IE/kg KGW) an Kälber nach 30 bis 45 Tagen an der Injektionsstelle noch bis zu 5 IE Penicillin/g nachzuweisen waren, während der restliche Tierkörper sowie die untersuchten Organe frei von nachweisbaren Rückständen waren (Nachweisgrenze: 0,06 IE/g). Hingegen konnten Teske et al. (1972) nach intramuskulärer Applikation von 33000 IE Procain Penicillin G/kg KGW in wäßriger Zubereitung (in Kombination mit Dihydrostreptomycin) an Ochsen zu den untersuchten Zeitpunkten (30, 60 und 90 Tage nach der Behandlung) keine Penicillin-Rückstände nachweisen; die Nachweisgrenze des mikrobiologischen Verfahrens lag bei 0,015 IE/g.

2.3.3.2. Aminoglycosid-Antibiotika

2.3.3.2.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma

Streptomycin und Dihydrostreptomycin sind in ihrer üblichen Verabreichungsform als Sulfat gut wasserlöslich und werden nach intramuskulärer Gabe rasch resorbiert, so daß die maximalen Wirkstoffspiegel im Plasma innerhalb von 1 bis 2 Stunden erreicht werden (Meyer Jones et al. 1977). Nach Angaben von Otten et al (1975) beträgt die Halbwertszeit beim erwachsenen Menschen etwa 2 bis 3 Stunden, wobei die Ausscheidung durch glomeruläre Filtration erfolgt (nur 1 bis 2 % werden insgesamt über Galle und Faeces eliminiert).

Stalheim (1970) konnte nach intramuskulärer Applikation von Dihydrostreptomycin (25 mg/kg KGW) an Schweine und Kühe nachweisen, daß bei beiden Tierarten 72 % der verabreichten Dosis innerhalb von 12 Stunden über die Nieren

ausgeschieden wurden.

Mercer et al.(1971a) berechneten für Dihydrostreptomycin-Sulfat nach intramuskulärer Injektion von 26 mg/kg KGW beim Schwein eine Halbwertszeit von 2,8 Stunden. Stalheim (1970) ermittelte Verteilungsvolumina von 21 % bzw. 23 % des Körpergewichts für das Schwein bzw. für das Rind. Das entspricht einem Verteilungskoeffizienten von ca. 0,2 Liter/kg.

Hammond (1953) berichtet, daß beim Rind nach Verabreichung von 11 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW nach 1 Stunde die Konzentrationen im Serum bei über 40 µg/ml lagen; Dosierungen von 18,75 mg/kg KGW führten zu Werten von über 60 µg/ml. Nach 24 Stunden waren die Konzentrationen jeweils auf ca. 1 µg/ml Serum abgesunken, z. T. waren diese Werte jedoch bereits nach 12 Stunden erreicht. Hammond (1953) verwendete für seine Untersuchungen wäßrige Lösungen. Stalheim (1970) führte Untersuchungen mit ³H-markiertem, wäßrig gelöstem Dihydrostreptomycin bei Rind und Schwein durch. Nach einer Dosierung von 25 mg/kg KGW waren die Maximalwerte von ca. 80 µg/ml nach 1 bis 2 Stunden (Rind) bzw. nach 3 bis 4 Stunden (Schwein) erreicht; nach ca. 10 Stunden waren die Konzentrationen auf ca. 1 µg/ml abgesunken.

Mercer et al. (1971b) geben für das Rind an, daß 4 Tage nach intramuskulärer und subkutaner Applikation von 7,3 mg Dihydrostreptomycin-Sulfat/kg KGW die Wirkstoffkonzentrationen im Serum bei 0,03 µg/ml und damit im Bereich der Nachweisgrenze des angewandten mikrobiologischen Verfahrens lagen. Auch hier handelte es sich um Arzneimittel in wäßriger Zubereitung.

Diese Untersuchungen (Mercer et al. 1971b) weisen auch darauf hin, daß sich der Konzentrationsverlauf der Wirk-

stoffspiegel im Serum nach i. m.- und s. c.-Verabreichung weitgehend entspricht und damit für beide Applikationsformen mit einem ähnlichen Rückstandsverhalten in den Geweben gerechnet werden kann.

Teske et al. (1972) konnten nach Verabreichung von 41,25 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW an Ochsen über eine Dauer von 96 Stunden Wirkstoffkonzentrationen im Serum nachweisen; der nach 24 Stunden gemessene Wert lag bei ca. 1 µg/ml. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Hammond (1953) und Stalheim (1970).

2.3.3.2.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch

Nach intramuskulärer Applikation von 11 mg Dihydrostreptomycin an Kühe konnte Hammond (1953) nur bei einem Tier (von insgesamt 7 Tieren) einen konzentrationsabhängigen Wirkstoffübergang vom Serum in die Milch nachweisen. In Tabelle 4 sind für dieses Tier die gemessenen Wirkstoffkonzentrationen im Serum und in der Milch wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß etwa zwischen der 6. und 9. Stunde nach der Behandlung die Wirkstoffkonzentrationen im Serum und Milch etwa gleich hoch liegen; im Serum sinken die Werte ab der 12. Stunde auf die Nachweisgrenze des Verfahrens ab, in der Milch ist dies erst ab der 24. Stunde der Fall.

Tabelle 4: Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) von Dihydrostreptomycin im Serum und in der Milch nach intramuskulärer Applikation (Hammond 1953)

Stunden post appl. :	1	2	4	6	9	12	18	24
Konz. im Serum ($\mu\text{g/ml}$)	12,0	9,2	6,0	7,7	4,2	-	-	-
Konz. in der Milch ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	2,4	6,3	4,5	3,6	2,2	-

- = unter der Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{g/ml}$

Blobel und Burch (1960) verabreichten ebenfalls 11 mg Dihydrostreptomycin-Sulfat/kg KGW intramuskulär an 24 Kühe. Die nachweisbaren Wirkstoffkonzentrationen in der Milch lagen nach 12 und 24 Stunden im Bereich von 0,05 (dies entspricht der Nachweisgrenze) bis 0,125 µg/ml. In der Milch aller behandelten Kühe waren nach 48 Stunden keine Hemmstoffe mehr nachweisbar.

Ziv et al. (1974) führten anhand von Tracer-Studien sowie unter Verwendung eines mikrobiologischen Verfahrens Untersuchungen zum Übergang von Dihydrostreptomycin vom Serum in die Milch bei Schafen durch. Eine Dosis von 20 mg/kg KGW (wässrige Lösung) wurde 2 Tieren intramuskulär verabreicht. Nachdem im Serum die Wirkstoffkonzentrationen innerhalb 1 Stunde auf über 80 µg/ml angestiegen waren, um daraufhin in einem Zeitraum von 12 Stunden auf ca. 1,0 µg/ml abzufallen, wurden die höchsten Wirkstoffkonzentrationen in der Milch mit ca. 8 µg/ml etwa 8 Stunden post appl. nachgewiesen, wobei die mikrobiologische Methode jedoch nur Werte um 1 µg/ml ergab. Die weiteren Messungen bis zur 48. Stunde nach Verabreichung - bei Heranziehung der Tracer-Studien - ergaben Werte bis zu 3 µg/ml, die damit z. T. höher als die im Serum gemessenen lagen, während mittels der mikrobiologischen Methode nur Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden konnten, die stets unterhalb der im Serum gemessenen Werte lagen.

2.3.3.2.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben

Nouws und Ziv (1978a) konnten in der Muskulatur notgeschlachteter Rinder, trotz der zu erwartenden verzögerten Ausscheidung aufgrund veränderter Resorptionsverhältnisse und Stoffwechselfunktionen, 48 Stunden nach der Applika-

tion therapeutischer Dosierungen (z. T. jedoch bereits 13 Stunden nach Behandlung) nur noch Rückstandskonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze des mikrobiologischen Verfahrens (ca. 0,4 µg/g) nachweisen, während im Blutserum die Aminoglycosidrückstände bis 96 Stunden nachgewiesen werden konnten.

Weitere Befunde von Nouws und Ziv (1977b) bestätigen, daß die Aminoglycosidkonzentrationen im Serum bis zu 20mal höher liegen können als in den Organen und dementsprechend länger nachweisbar sind. Dies gilt jedoch nicht für die Niere. Nach einer Behandlung von Rindern mit 10 mg/kg KGW lagen 24 Stunden post appl. die Wirkstoffkonzentrationen im Serum im Bereich von 0,6 µg/ml, in der Nierenrinde jedoch bei 47,8 µg/g. Tabelle 5 gibt einen Überblick zum Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Anschluß an die Behandlung. Mercer et al. (1970) verabreichten Schweinen an 4 aufeinander folgenden Tagen je 44 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW (in wäßriger Zubereitung) intramuskulär. Die Tiere wurden 10 Stunden nach der letzten Applikation geschlachtet. In der Muskulatur (Nicht-Injektionsstelle) konnten zu diesem Zeitpunkt im Mittel 4,16 µg/g, in der Leber 16,4 µg/g und in der Niere 257,0 µg/g nachgewiesen werden.

Über Rückstände an der Injektionsstelle berichten Rasmussen und Høgh (1971). Bei Rindern und Schweinen konnten nach Verabreichung therapeutischer Dosen verschiedener im Handel erhältlicher Kombinationspräparate (Streptomycin in Kombination mit Penicillin) in wäßrigen Zubereitungen nach 6 Tagen Rückstände an den Injektionsstellen nachgewiesen werden. Die Konzentrationen des Aminoglycosidanteils lagen in einem Bereich von 3 bis 6 µg/g Muskelgewebe. Die Muskulatur außerhalb des Injektionsstellenbereichs enthielt keine nachweisbaren Rückstände. In weiteren Untersuchungen an Kälbern konnten Mercer et al. (1971b) nach Verabreichung eines Kombinationspräparates aus

Tabelle 5: Verlauf der Dihydrostreptomycin-Konzentrationen in Organen und im Serum vom Rind nach einmaliger intramuskulärer Verabreichung von 10 mg/kg KGW (Nouws und Ziv 1977b)

Stunden nach Behandlung	Serum	Wirkstoffkonzentrationen in µg/g bzw. ml in				Muskel- homogenisat	Leber
		Nierenrinde	Nierenmark	Muskelpressaft			
2	19,6 (1,0)	42,5 (0,6)	32,5 (3,4)	3,46 (0,9)		3,40 (0,45)	1,25 (0,82)
24	0,61 (0,23)	47,8 (9,9)	22,1 (5,6)	<0,3		<0,6	-
68	0,2	4,13 (0,26)	3,75 (0,50)	<0,3		<0,6	<0,6

Zahlen in Klammern = Standardabweichung

Dihydrostreptomycin (7,3 mg/kg KGW) und verschiedenen Penicillinen (in wäßriger Zubereitung) nach 30 und 45 Tagen nach der Behandlung Rückstände um 8 µg Dihydrostreptomycin/g Gewebe an der Injektionsstelle nachweisen:

Teske et al. (1972) bestätigen diese Ergebnisse. Nach einer intramuskulären Applikation von ca. 40 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW (in Kombination mit Procain Penicillin) in wäßriger Zubereitung an 14 Ochsen konnten sie nach 30, 60 und 90 Tagen noch Rückstände von Dihydrostreptomycin an der Injektionsstelle (und in den Nieren) feststellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

2.3.3.3. Tetracycline

2.3.3.3.1. Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma

Die klassischen Tetracycline (siehe Seite 10) sind in ihrer zur parenteralen Applikation am häufigsten angewandten Form, den Salzen (z. B. Oxytetracyclin-HCl), gut wasserlöslich. Nach Angaben von Otten et al. (1975) werden beim Erwachsenen nach einer intramuskulären Injektion von 4 mg Tetracyclin oder Oxytetracyclin/kg KGW nach 3 bis 4 Stunden die höchsten Werte im Serum erreicht (2,5 µg/ml). Zwischen 40 und 70 % der so verabreichten Dosis werden innerhalb von 24 Stunden über die Niere eliminiert; über die Faeces werden dagegen nur etwa 6 bis 10 % ausgeschieden. Das Chlortetracyclin sowie die neueren Verbindungen Doxycyclin und Minocyclin dagegen werden zum größten Teil über Faeces und Galle eliminiert (Barza und Scheife 1976). Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Oxytetracyclin wurden von Baggot et al. (1977) an Hunden durchgeführt, wobei sie der Auswertung der mit einer mikrobiologischen Methode erhaltenen Meßwerte ein 3-Kompartimentmodell zugrunde legen. Nach intravenöser

Tabelle 6: Rückstände von Dihydrostreptomycin an der Injektionsstelle und in der Niere nach einer einmaligen intramuskulären Verabreichung an Ochsen (Teske et al. 1972)

Tage nach Verabreichung	Wirkstoffkonzentration in µg/g	
	Injektionsstelle	Niere
30	12,0	1,9
30	3,2	2,0
60	7,3	0,6
60	8,0	0,7
90	3,4	0,8
90	1,1	0,9

- 60 -

Nachweisgrenze des mikrobiologischen Verfahrens für Dihydrostreptomycin: 0,05 µg/g

Verabreichung von 5 mg/kg KGW ergab sich eine mittlere Halbwertszeit von $6 \pm 1,5$ Stunden. Der Verteilungskoeffizient betrug $2 \pm 0,4$ Liter/kg. Nachdem unmittelbar nach der Applikation Wirkstoffkonzentrationen um 10 µg/ml im Serum erreicht worden waren, fielen diese innerhalb von 12 Stunden auf 0,5 µg/ml ab.

Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangte Pilloud (1973), der zur Auswertung seiner Versuche an Kühen und Pferden ein 2-Kompartimentmodell heranzog (der Nachweis des Arzneimittels im Serum wurde mittels einer Fluoreszenz-Methode durchgeführt). Nach intravenöser Verabreichung von 2,5 mg Oxytetracyclin/kg KGW konnte für die Rinder eine Halbwertszeit von $9,12 \pm 0,67$ Stunden und für die Pferde eine solche von $10,5 \pm 1,3$ Stunden ermittelt werden. Die Oxytetracyclinkonzentrationen im Serum unmittelbar nach der Verabreichung waren jedoch entsprechend der Dosierung relativ niedrig. Sie lagen bei 1,85 (Pferd) bis 2,4 (Rind) µg/ml und sanken nach ca. 12 Stunden auf 0,5 bis 1 µg/ml ab. Der für das Rind ermittelte Verteilungskoeffizient ergab sich mit $1,04 \pm 0,07$ Liter/kg.

Mercer et al. (1978) ermittelten bei ihren Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Oxytetracyclin beim Schwein nach i.v.-Applikation eine Halbwertszeit von $3,87 \pm 0,62$ Stunden; der mittlere Verteilungskoeffizient lag bei $1,26 \pm 0,18$ Liter pro kg.

Beim Schwein wurden nach i. v.-Verabreichung von 11 mg Oxytetracyclin-HCl/kg KGW unmittelbar nach der Applikation die sehr hohen Konzentrationen von 80 bis 180 µg/ml im Serum gemessen (Mittel: 93,82 µg/ml), die 12 Stunden später auf Werte um ca. 0,6 µg/ml abgefallen waren (Mercer et al. 1978). Zum Zeitpunkt 32 Stunden post appl. bewegten sich die Werte im Bereich der Nachweisgrenze (0,06 µg/ml) des mikrobiologischen Verfahrens.

Messungen der Oxytetracyclinkonzentrationen im Serum von gesunden, von an Pneumonie erkrankten sowie von rekonvaleszenten Rindern wurden von Clark et al. (1974) durchgeführt. Oxytetracyclin wurde in einer Dosierung von 11 mg/kg KGW intravenös, intramuskulär und subkutan verabreicht. Sowohl in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand (erkrankte Tiere wiesen zunächst höhere Konzentrationen auf) als auch der Art der Applikation ergaben sich Unterschiede im Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen. Tabelle 7 gibt die Oxytetracyclin-Konzentrationen im Serum gesunder und an Pneumonie erkrankter Tiere nach intramuskulärer und subkutaner Verabreichung wieder.

2.3.3.3.2. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch

Der Übergang der Tetracycline vom Serum in die Milch ist u. a. abhängig von ihrer Lipidlöslichkeit. Oxytetracyclin weist eine etwas geringere Lipidlöslichkeit auf als Tetracyclin (Otten et al. 1975). Høgh und Rasmussen (1972) untersuchten beim Rind den Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen in der Milch nach intramuskulärer Verabreichung von 8 mg Tetracyclin-HCl-Lösung/kg KGW. Wie Tabelle 8 zeigt, konnten zu allen erfaßten Zeitpunkten in der Milch höhere Konzentrationen als im Serum nachgewiesen werden; nach 48 Stunden waren im Serum keine Hemmstoffe mehr nachzuweisen, während in der Milch sich jedoch noch Werte im Bereich der Nachweisgrenze (0,1 µg/ml) des Verfahrens ergaben.

Ähnliche Untersuchungen wurden von Ziv et al. (1974) an Schafen durchgeführt. Nach intramuskulärer Verabreichung von 20 mg/kg KGW (gelöst in 0,1 n HCl), wobei sowohl eine Tracermethode (³H-markiertes Tetracyclin) als auch eine mikrobiologische Methode zur Anwendung kamen, ergab

Tabelle 7: Konzentrationen von Oxytetracyclin im Serum gesunder und an Pneumonie erkrankter Rinder nach intramuskulärer und subkutaner Applikation von 11 mg/kg KGW (Clark et al. 1974)

Verabreichungsform	Verlauf der Wirkstoffkonzentration 1 - 48 Stunden nach der Behandlung										
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	16	48
Werte der gesunden Tiere:	Konz. in µg/ml										
<u>intramuskulär</u>											
eine Inj.Stelle	1,8	2,6	2,7	3,1	3,3	3,8	3,5	-	-	-	1,2
mehrere Inj.Stellen	3,4	4,8	5,2	5,1	4,7	4,6	3,8	3,4	2,9	2,0	1,2
											0,2
<u>subkutan</u>											
eine Inj.Stelle	0	0,4	0,8	1,6	2,0	2,4	3,0	-	-	-	1,0
mehrere Inj.Stellen	1,6	2,5	3,0	3,5	4,1	4,2	3,9	3,6	3,4	2,3	1,4
											0,2
Werte der erkrankten Tiere:											
<u>subkutan</u>											
	0,8	-	2,0	-	3,2	4,0	4,3	4,6	4,1	-	2,8
<u>intramuskulär</u>	4,4	-	5,7	-	5,5	5,7	5,0	5,0	3,9	-	2,1
											-

Inj.Stelle(n) = Injektionsstelle(n)

0 = unter der Nachweisgrenze (o. A.)

- = nicht untersucht

Tabelle 8: Tetracyclinkonzentrationen im Serum und in der Milch von Kühen nach intramuskulärer Verabreichung von 8 mg/kg KGW (Høgh und Rasmussen 1972)

Konz. (ug/ml)	Stunden nach Verabreichung			
	6	12	24	30
im Plasma	1,0	0,7	0,2	0,1
in der Milch	1,75	1,4	0,8	0,3

sich innerhalb von 2 Stunden post appl. ein Anstieg der Wirkstoffkonzentrationen im Serum auf ca. 5 µg/ml, die 48 Stunden später auf Werte um 0,05 µg/ml abgesunken waren. In der Milch wurden Wirkstoffkonzentrationen von ca. 0,8 (Tracermethode) bzw. 1,5 (mikrobiologischer Nachweis) µg/ml 4 Stunden nach der Behandlung gemessen.

Wie dazu aus Tabelle 9 hervorgeht, liegen ab der 6. Stunde post appl. die Wirkstoffkonzentrationen in der Milch höher als im Serum. Dies konnte jedoch nur anhand der mikrobiologischen Methode nachgewiesen werden. Die Tracer-Studien ergaben zu jedem Zeitpunkt in der Milch niedrigere Wirkstoffkonzentrationen als im Serum.

2.3.3.3.3. Wirkstoffkonzentrationen in eßbaren Geweben

Mit Rückständen von Tetracyclin, Oxy- und Chlortetracyclin ist vor allem in der Niere zu rechnen, da der größte Teil der Elimination über dieses Organ verläuft (siehe 2.3.3.3.1.). Dies wird durch Untersuchungen von Pakkala et al. (1976) bestätigt, die Kühen und Kälbern Oxytetracyclin (in wäßriger Zubereitung) in einer Dosierung von 5 mg/kg KGW intramuskulär verabreichten. Acht Tage post appl. wurden bei den Kühen - nicht dagegen bei den Kälbern - in der Niere Hemmstoffe im Bereich der Nachweisgrenze (ca. 0,5 µg/g) festgestellt. In der Muskulatur, die nicht aus dem Injektionsstellenbereich stammte, konnten keine Rückstände nachgewiesen werden.

Diese Angaben werden durch frühere Untersuchungen von Rasmussen und Høgh (1971) an Rindern und Schweinen bestätigt, die zeigten, daß nach intramuskulärer Injektion von 8 mg Oxytetracyclin (wäßrige Lösung)/kg KGW nach 6tägiger Wartezeit die Nieren noch antimikrobiell wirksame Rückstände enthielten (10,5 und 4,0 µg/g), während

Tabelle 9: Konzentrationen von Tetracyclin im Serum und in der Milch von Schafen nach parenteraler Verabreichung (Ziv et al. 1974)

Substrat und Methodik	Konz. ($\mu\text{g/ml}$); Stunden nach Verabreichung									
	1	2	4	6	8	10	12	24	32	48
Serum (Tracer-Studien)	2,5	5,0	3,5	1,3	0,8	0,5	0,3	0,25	0,15	0,05
Milch (Tracer-Studien)	-	0,5	0,8	0,7	0,45	0,3	0,2	0,06	-	0,04
Serum (mikrob. Nachweis)	2,0	4,0	3,0	1,0	0,7	0,45	0,25	0,2	0,1	0,045
Milch (mikrob. Nachweis)	0,3	0,7	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25	-	0,09

- = nicht untersucht

die Muskulatur (außer der Injektionsstelle) keine nachweisbaren Antibiotikakonzentrationen aufwies. Nach Applikation derselben Dosis Tetracyclin konnten zum gleichen Zeitpunkt in den Nieren ebenfalls noch Rückstände im Bereich von 0,5, 2,8 und 7,0 $\mu\text{g/g}$ nachgewiesen werden.

Vergleichende Untersuchungen von Nouws und Ziv (1977a) an gesunden und notgeschlachteten Rindern ergaben, daß die Verweildauer der verabreichten Antibiotika im Organismus durch den Krankheitszustand offensichtlich deutlich beeinflußt wird. Nach 4 bis 5 Tagen wurden in Nierenrinde, Blutserum und Urin gesunder Tiere 0,29, 0,08 und 2,12 μg Oxytetracyclin/g bzw. ml nachgewiesen, während die entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen bei den kranken Tieren bei 4,2, 0,44 und 6,2 $\mu\text{g/ml}$ lagen. Die Verteilungsverhältnisse Muskulatur/Serum und Nierenrinde/Serum lagen bei 0,5 und 6 bzw. 7. Im Bereich der Injektionsstelle konnten Rasmussen und Høgh (1971) bei ihren Untersuchungen an Rindern und Schweinen nach Applikation tetracyclin- (und penicillin- und streptomycin-) haltiger Arzneimittel relativ hohe Werte nach einem Zeitraum von 6 Tagen nachweisen. Die Tetracyclinrückstände lagen bei bis zu 900 $\mu\text{g/g}$ Gewebe. Die Arzneimittel waren in therapeutischen Dosierungen (8 mg/kg KGW) und in wäßriger Lösung verabreicht worden.

2.4. Angaben zur Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln nach i. m.- und s. c.-Applikation in Abhängigkeit von der Applikationsstelle unter besonderer Berücksichtigung der Situation beim Rind

Ausgehend von der in Kapitel 2.3.2. dargelegten Problematik hinsichtlich des Verbleibs nicht unerheblicher Wirkstoffkonzentrationen als Depot am Ort der Applikation nach i. m.-Injektion wurde von Bergsjö (1976) die Frage aufgeworfen, inwieweit anstelle der i. m.-Applikation die

s. c.-Verabreichung herangezogen werden kann. Hierzu verglich er in seinen Versuchen beim Rind die Wirkstoffkonzentrationen im Serum nach Verabreichung einer wäßrigen Penicillin G-Na-Zubereitung von 10000 IE/kg KGW, das entspricht 20 ml, die einmal intramuskulär in die Hinterhandmuskulatur und einmal subkutan in den Triel verabreicht wurde. Als Versuchstiere dienten 6 Kühe (Norwegian Red), die alle über 2 Jahre alt waren. Bereits 1/2 Stunde nach der intramuskulären Injektion wurden die höchsten Konzentrationen im Serum gemessen (ca. 8 IE/ml), während zur gleichen Zeit die Wirkstoffspiegel nach s. c.-Injektion nur etwa halb so hoch waren, jedoch im therapeutisch wirksamen Bereich lagen. Allerdings gelang nach Applikation in den Triel der Wirkstoffnachweis im Serum über einen längeren Zeitraum als nach der i. m.-Injektion (10 gegenüber 4 bis 8 Stunden). Aufgrund dieser Ergebnisse hält Bergsjö (1976) den Triel für eine geeignete Applikationsstelle. In diesem Zusammenhang fordert er auch die Festsetzung einer bestimmten Injektionsstelle, die in jedem Fall bei der Schlachtung aufzufinden ist und notfalls entfernt werden kann.

Auch Mercer et al. (1971b) befassen sich mit dem Problem der Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln nach verschiedenen Applikationsarten. Sie führten ihre Untersuchungen an 10 Ochsen (10 bis 12 Monate alt) durch, wobei die Dosis von 8800 IE Procain- und Benzathin-Penicillin G und 7,3 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW (in wäßriger Zubereitung) jeweils 5 Tieren intramuskulär (Glutaeusmuskulatur) und 5 Tieren s. c. verabreicht worden war.

Wie aus der Zusammenstellung in Tabelle 10 hervorgeht, konnten sie keine Unterschiede im Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen feststellen. In Konsequenz schlagen Mercer et al. (1971b) vor, beim Rind anstelle der intramuskulären nur noch die subkutane Applikationsform anzuwenden, obwohl in ihren speziell dazu durchgeführten

Tabelle 10: Wirkstoffkonzentrationen im Serum von Rindern nach intramuskulärer und subkutaner Verabreichung eines Kombinationspräparates aus Procain- und Benzathin Penicillin G und Dihydrostreptomycin (Mercer et al. 1971b)

gemessener Wirkstoff und Art d. Applikation	Wirkstoffverlauf; Stunden nach der Behandlung						
	1	2	4	8	24	48	72
Penicillin (IE/ml)							
i. m.-Verabreichung	1,258	1,154	0,364	0,177	0,083	0,041	0,028
s. c.-Verabreichung	1,182	1,598	0,393	0,168	0,085	0,047	0,027
Dihydrostreptomycin (μ g/ml)							
i. m.-Verabreichung	28,54	22,98	12,10	4,88	0,398	0,074	0,060
s. c.-Verabreichung	27,50	20,62	14,52	6,25	0,468	0,096	0,054

Untersuchungen keine Angaben über den Verbleib von Rückständen im Bereich der s. c.-Injektionsstelle gemacht werden.

Messungen zur Bioverfügbarkeit von Oxytetracyclin (5 mg/kg KGW) nach subkutaner und intramuskulärer Applikation bei gesunden, an Pneumonie erkrankten und rekonvaleszenten Rindern wurden von Clark et al. (1974) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden die Injektionsvolumina z. T. auch auf mehrere Stellen verteilt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen wurde bereits in Tabelle 7 zusammengefaßt. Es zeigt, daß speziell nach der i. m.-Applikation bei den erkrankten Tieren zunächst höhere Werte gemessen wurden als bei den gesunden. Allerdings ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Nachweisbarkeit antimikrobiell wirksamer Substanzen im Serum. Sehr deutliche Unterschiede zeigten sich dagegen, wenn die Injektion auf eine oder mehrere Stellen verteilt wurde. So fällt auf, daß Wirkstoffspiegel, wie sie nach einmaliger i. m.-Applikation gemessen wurden, bei s. c.-Verabreichung nur bei Verteilung auf mehrere Injektionsstellen erreicht wurden (Tabelle 7).

Da es im Hinblick auf das Rückstandsrisiko zunächst als nicht vertretbar angesehen werden kann, das Wirkstoffdepot auf mehrere Stellen zu verteilen, kommt der Auswahl der Injektionsstelle eine besondere Bedeutung zu, wobei die Frage, inwieweit die i. m.-Injektion durch die s. c.-Injektion gänzlich ersetzt werden kann, wegen der z. T. divergierenden Resultate (s. o.) zunächst als offen bezeichnet werden muß.

Beim Rind wird gewöhnlich eine intramuskuläre Injektion in die Hinterhandmuskulatur verabreicht. Dabei muß es wohl als unrealistisch angesehen werden, daß eine Injektionsstelle in diesem Bereich regelmäßig bei der Schlachtung indentifiziert und gegebenenfalls verworfen werden kann.

Im Hinblick auf die der Arbeit zugrunde liegende Fragestellung wurde daher bereits vor der Durchführung der praktischen Versuche durch das Bundesgesundheitsamt in Zusammenarbeit mit dem Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie (BPI) eine Umfrage bei verschiedenen Veterinärkliniken durchgeführt, wie neben dieser üblichen Applikationsstelle die i.m.-Injektion in die Anconaeusmuskulatur (Ellbogenmuskulatur: vorwiegend M.triceps brachii) bzw. die s.c.-Injektion in den Triel bewertet werden kann. Die Mehrheit der befragten Veterinärkliniker hatte gegen keine der beiden Applikationsstellen besondere Bedenken.

Mit vorliegender Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, zur weiteren Klärung hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln nach Injektion an verschiedenen Körperstellen beizutragen. Gleichzeitig sollten einige Erfahrungen über die Praktikabilität der i. m.-Injektion in die Anconaeusmuskulatur¹⁾ und s. c.-Injektion in den Triel unter Praxisbedingungen eingeholt werden.

1) Die Injektion in die Anconaeus- oder Ellbogenmuskulatur wird im weiteren Teil der Arbeit verkürzt als "i.m.-Anconaeus" bezeichnet.

3. Eigene Untersuchungen (Material und Methodik)

3.1. Durchführung der Tierversuche (Versuchsplan)

3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Kühe, Färsen (Jungrinder bis zum Alter von 1 Jahr) und Kälber, die auf dem Versuchsgut Marienfelde des Bundesgesundheitsamtes gehalten wurden. Das Alter, das Geschlecht und das Körpergewicht der einzelnen Tiere sind in der Tabelle 11 zum Versuchsplan aufgeführt. Die Kühe und Färsen wurden in Einzelständen mit Einstreu oder Gummimatten, die Kälber in Boxen mit Einstreu aufgestellt. Das Futter bestand je nach Jahreszeit aus Heu, Häcksel, Schnittgras, Treber und Kraftfutter. Zur Erleichterung der Blutentnahme (siehe Kapitel 3.1.5.1.) wurden die Tiere mit Strickhalftern versehen.

In die Versuche wurden zunächst nur klinisch gesunde Tiere einbezogen, wobei zur weiteren Absicherung der klinischen Diagnose folgende Serumwerte erfaßt wurden: GOT, γ -GT, alkalische Phosphatase und Harnstoff.

Sofern ein Tier nach Versuchsbeginn erkrankte und behandelt werden mußte, wird darauf in den Tabellen 12 a-g hingewiesen.

3.1.2. Verwendete Arzneimittel

Folgende im Handel erhältliche Arzneimittel wurden in insgesamt 6 Versuchen (Versuche Nr. 1-6) nach dem in Kapitel 3.1.3. dargelegten Behandlungsschema verabreicht:

Versuch 1

Präparat: Ampicillin 10 %^R

Vertrieb bzw. Hersteller: A. Albrecht

1 ml enthält 100 mg Ampicillin-Trihydrat in wässriger Suspension

Dosierungsvorschrift des Herstellers zur Anwendung beim Rind: 10 ml pro 100 kg Körpergewicht

Wartezeit zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung:

20 Tage für eßbare Gewebe, 4 Tage für Milch

Versuch 2

Präparat: Procain Penicillin-Albrecht^R

Vertrieb bzw. Hersteller: A. Albrecht

1 ml enthält 300000 IE Procain Penicillin G in wässriger Suspension

Dosierungsvorschrift des Herstellers zur Anwendung

beim Rind: 10 - 15 ml pro Tier

beim Jungrind: 4 - 10 ml pro Tier

beim Kalb: 2 - 5 ml pro Tier

Nach § 15(2) LMBG galt zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine Wartezeit von 5 Tagen für eßbare Gewebe und Milch.

Versuch 3

Präparat: Tardomyocel pro inj. ad us. vet.^R

Vertrieb bzw. Hersteller: Bayer AG

1 ml enthält 200000 IE Benzathin Penicillin G und 50000 IE Procain Penicillin G in wässriger Suspension

Dosierungsvorschriften des Herstellers zur Anwendung

beim Rind: 4 ml pro 100 kg Körpergewicht

beim Kalb: 3 ml pro 50 kg Körpergewicht

Nach § 15(2) LMBG galt zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine Wartezeit von 5 Tagen für eßbare Gewebe und Milch.

Versuch 4

Präparat: Langzeit-Penicillin-Dihydrostreptomycin^R

Vertrieb bzw. Hersteller: Atarost

1 ml enthält 80000 IE Benzathin Penicillin G,
120000 IE Procain Penicillin G und 258 mg Dihydro-
streptomycinsulfat in wässriger Suspension.

Dosierungsvorschriften des Herstellers zur Anwendung
beim Rind: 10 - 20 ml pro Tier

beim Kalb: 5 - 10 ml pro Tier

Wartezeit zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung:

50 Tage für eßbare Gewebe, 12 Tage für Milch.

Versuch 5

Präparat: Terramycin 100^R

Vertrieb bzw. Hersteller: Pfizer GmbH

1 ml enthält 100 mg Oxytetracyclin-HCl in wässriger
Lösung

Dosierungsvorschriften des Herstellers zur Anwendung
beim Rind: 10 - 15 ml pro Tier

beim Kalb: 2,5 - 5 ml pro Tier

Nach § 15(2) LMBG galt eine Wartezeit von 5 Tagen für
eßbare Gewebe und Milch.

Versuch 6

Präparat: Terramycin LA^R

Vertrieb bzw. Hersteller: Pfizer GmbH

1 ml enthält 200 mg Oxytetracyclin in wässriger
Lösung

Dosierungsvorschriften des Herstellers zur Anwendung
beim Rind: 10 ml pro 100 kg Körpergewicht. Ab 20 ml
Injektionsvolumen soll dieses auf 2 Injektionsstellen
verteilt werden.

Wartezeit zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung:

21 Tage für eßbare Gewebe, 6 Tage für Milch.

Tabelle 11: Alter, Geschlecht und Körpergewicht der Versuchstiere bei Durchführung der Versuche 1 - 6 (s. a. Tab. 2 a - g)

Kuh/ Färse/ Kalb	Tier Nr.	kg Körpergewicht (KGW) und Alter (A) in Monaten									
		2.1.80 (KGW/A)	13.2.80 (KGW/A)	22.2.80 (KGW/A)	10.3.80 (KGW/A)	20.5.80 (KGW/A)	29.6.80 (KGW/A)	20.11.80 (KGW/A)	13.1.81 (KGW/A)	9.3.81 (KGW/A)	
Kuh	HB 13	618/53									
Kuh	HB 15	744/35									
Kalb/Färse	Ohr 231	119/3	146/4,5		160/5,5			258/14	312/15	337/16	
Kalb/Färse	Ohr 232	111/3	137/4,5		155/5,5			341/14	377/15	411/16	
Kalb (männl.)	Ohr 271	91/2	101/3,5			147/8					
Kalb (männl.)	Ohr 272	69/2	83/3,5		109/4,5	157/8					
Kalb (männl.)	Ohr 269	79/2	106/3,5								
Kuh	HB 7			690/27							
Kuh	HB 25			672/110		364/17					
Färse	Ohr 772			391/14	373/15	473/23					
Färse	Ohr 216			409/20	464/21						
Färse	Ohr 218			347/17							
Färse	Ohr 219			330/16							
Kuh	HB 28				364/17	384/19			713/79		
Kuh	HB 24				674/50	710/19			329/13	356/15	
Kalb/Färse	Ohr 581					735/52		299/12	204/13		
Kalb/Färse	Ohr 589					171/6		230/12			
Kuh	HB 3					139/6					
Kuh	HB 26					661/52					
Kuh	HB 12					627/29					
Kuh	HB 9a						649/126		726/133		
Kuh	HB 9b						615/36				
Kuh	HB 16							564/29			
Färse	Ohr 233							554/132	334/14	365/16	
Färse	Ohr 220					357/18		323/13			

Tabelle 12a: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 1

Präparat: Ampicillin 10 % R

Wirkstoff und Dosierung: Ampicillin-Trihydrat in wässriger Suspension: 10 (Kühe) bzw. 15 (Kälber) mg/kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 3. 1. - 17. 1. 80 B: 13. 2. - 21. 2. 80

C: 25. 2. - 2. 3. 80 D: 10. 3. - 18. 3. 80

Versuchstier	Kuh 13(28) Kuh 15 Kalb 231 Kalb 232 Kalb 271 ²⁾ Kalb 272 Kalb 269 ¹⁾									
Injektionsvolumen	Versuchsdg. A	70(13)	75 ⁴⁾	18	17	14	10	12		
pro Tier in ml	Versuchsdg. B	68(13)	75	22	20,5	15	12,5	16		
	Versuchsdg. C)	68(28)	75	22	20,5	15	12,5	-		
	Versuchsdg. D)									
Auswahl der Applikationsstelle	i. m. Anconaeus	C,D ³⁾	-	C	D	A	C	-		
pro Versuchsdurchgang	s. c. Triel	A	B	B	A	C	B	A		
	i. m. Hinterhand	B	A	A	B	D	D	a		
	s. c. Hals	-	C,D	D	C	B	A	B		

Besondere Bemerkungen:

- 1) Nr. 269 wird am 21. 2. 80 im Rahmen des Versuchsplans nach dem 2. Versuchsdurchgang (B) geschlachtet
- 2) Nr. 271 erkrankt an einer akuten, hochfieberigen Pneumonie am 5. 3. 80; Maßnahmen s. unter 3.1.4.
- 3) Nr. 13 erkrankt an einer Mastitis und wird wegen dadurch notwendiger antibiotischer Behandlung in den Versuchsdurchgängen C und D gegen Nr. 28 ausgetauscht.
- 4) Das Injektionsvolumen wurde auf 2 Stellen verteilt.

Tabelle 12b: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 2

Präparat: Procain Penicillin "Albrecht"^R

Wirkstoff und Dosierung: Procain Penicillin G in wässriger Suspension; 20000 IE pro kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 23. 1. - 30. 1. 80

B: 6. 2. - 15. 2. 80

C: 10. 3. - 18. 3. 80

D: 19. 3. - 28. 3. 80

Versuchstier	Kuh 7	Kuh 25	Färse 772	Färse 218 ¹⁾	Färse 216	Färse 219
Injektionsvolumen	Versuchsdg. A)					
pro Tier in ml	Versuchsdg. B) 46	42	26	23	27	22
	Versuchsdg. C)					
	Versuchsdg. D)					
Auswahl der Applikationsstelle	i. m. Anconaeus	A	D	-	B	A C
pro Versuchsdurchgang	S. C. Triel	B	A	D	-	B A
	i. m. Hinterhand	C	B ²⁾	B	A	C D
	S. C. Hals	D	C	C, A	-	D B

Besondere Bemerkungen:

- 1) Nr. 218 wird am 21. 2. 80 im Rahmen des Versuchsplans nach dem 2. Versuchsdurchgang (B) geschlachtet.
- 2) Nr. 25 erhält am 7. 2. 80 ohne Rücksprache mit dem Versuchsleiter im Rahmen einer ambulanten tierärztlichen Behandlung lokal 5 ml PNF-Suspension^R während des 2. Versuchsdurchgangs (B). 1 ml dieses Präparates enthält folgende Mengen antimikrobiell wirksamer Substanzen: Procain Penicillin G 50,54 mg; Neomycinsulfat 61,20 mg; Nitrofurazon 10,00 mg.

Tabelle 12c: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 3

Präparat: Tardamyoel pro inj.^R

Wirkstoff und Dosierung: Procain- und Benzathin Penicillin G in wässriger Suspension; 20000 (Kühe) bzw. 30000 (Kälber) IE Penicillin/kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 21.5. - 4.6.80 B: 9.6. - 23.6.80 C: 30.6. - 14.7.80 D: 22.7. - 5.8.80

Versuchstier	Kuh 24	Kuh 28(12)	Kalb 271 ¹⁾	Kalb 272	Kalb 581	Kalb 589
Injektionsvolumen	Versuchsdg. A)	59	57 (28)	17	19	21
pro Tier in ml	Versuchsdg. B)				21	16
	Versuchsdg. C	59	52 (12)	-	19	21
	Versuchsdg. D	59	52 (12)	-	20	22
						17
Auswahl der Applikationsstelle	i. m. Anconaeus	B	A	-	C	D
pro Versuchs- durchgang	s. C. Triel	A	B ²⁾	B	D	A
	i. m. Hinterhand	D ⁴⁾	C	-	- ⁵⁾	B
	s. C. Hals	C ³⁾	D	A	B	C

Besondere Bemerkungen:

- 1) Nr. 271 wird am 30.6.80 im Rahmen des Versuchsplans nach dem 2. Versuchsdurchgang geschlachtet.
- 2) Nr. 28 abortiert am 18.6.80 während des 2. Versuchsdurchgangs (B) und wird wegen der eingeleiteten antibiotischen Behandlung im 3. und 4. Versuchsdurchgang durch Nr. 12 ersetzt.
- 3) Nr. 24 zeigt am 2.7.80 während des 3. Versuchsdurchgangs (C) eine Schwellung im Bereich der Injektionsstelle, die nach 3 Tagen verschwindet.
- 4) Nr. 24 zeigt am 25.7.80 während des 4. Versuchsdurchgangs (D) wieder eine Schwellung im Bereich der Injektionsstelle, die nach 2 Tagen zurückgeht.
- 5) Versehentlich bei Versuchsdurchgang A nicht behandelt; Versuch wiederholt wie in Tab. 12d angegeben.

Tabelle 12d: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 3a (Wiederholungsversuch, s. Tabelle 12 c, Fußnote 5)
 Präparat: Tardomyocel pro inj. R

Wirkstoff und Dosierung: Procain- und Benzathin Penicillin G in wäßriger Suspension; 30000 IE/kg K W
 Versuchsdurchgänge: A: 22. 11. - 3. 12. 80 B: 15. 1. - 21. 1. 81

Versuchstier	Färsen 581	
Injektionsvolumen	Versuchsdg. A	36
in ml	Versuchsdg. B	38
Auswahl der Applikationsstelle	i. m. Anconaeus	B
pro Versuchsdurchgang	i. m. Hinterhand	1) A

Besondere Bemerkungen:

1) Am 3. 12. 80 wird eine derbe, faustgroße Schwellung der Injektionsstelle festgestellt (letzter Versuchstag vom Durchgang A), die nach 4 Tagen verschwindet.

Tabelle 12e: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 4

Präparat: Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R

Wirkstoff und Dosierung: Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin in wäßriger Suspension; insgesamt 16000 IE Penicillin und 16 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 21. 5. - 4. 6. 80 B: 9. 6. - 23. 6. 80

C: 30. 6. - 14. 7. 80 D: 22. 7. - 5. 8. 80

Versuchstier	Kuh 3		Kuh 26/9a ⁴⁾		Färsen 772 ¹⁾		Färsen 219	Färsen 216	Färsen 220
Injektionsvolumen pro Tier in ml	Versuchsdg. A)	53	50 (26)	29	31	38	29		
	Versuchsdg. B)								
	Versuchsdg. C)	53	49 (9a)	29	31	38	29		
	Versuchsdg. D)								
Auswahl der Applikationsstelle pro Versuchsdurchgang	i. m. Anconaeus	B	A	B	D	C	D		
	s. C. Triel	A	B	-	B	A	C		
	i. m. Hinterhand	D	C ³⁾	-	A	B	B		
	s. C. Hals	C ³⁾	D	A	C ³⁾	D	A ²⁾		

Besondere Bemerkungen:

- 1) Nr. 772 wird am 30.6.80 im Rahmen des Versuchsplans nach dem 2. Versuchsdurchgang (B) geschlachtet.
- 2) Bei Nr. 220 wird am 23.5.80 eine Thrombophlebitis der Katheter-Vene diagnostiziert (Versuchsdg. A), der Katheter wird entfernt und die Behandlung erfolgt lokal mit Heparin-Salbe^R; am 1.6. ist die Schwellung zurückgegangen.
- 3) Am 1.7.80 zeigen Nr. 9a Nr. 3 und Nr. 219 schmerzhaft, bis zu handtellergroße Schwellungen der Injektionsstellen (Versuchsdurchgang C). Nach 3 bis 4 Tagen gehen diese zurück.
- 4) Am 30.6.80 wird Kuh Nr. 26 ab dem 3. Versuchsdurchgang (C) gegen Nr. 9a ausgetauscht.

Tabelle 12f: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 5

Präparat: Terramycin 100^R

Wirkstoff und Dosierung: Oxytetracyclin-HCL in wäßriger Lösung; 5 mg/kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 21.11. - 3.12.80 B: 14.1. - 27.1.81 C: 10.2. - 22.2.81 D: 10.3. - 22.2.81

Versuchstier	Kuh 9b(12) Kuh 16(24) Färsen 231 Färsen 232 Färsen 233 Färsen 589 ¹⁾							
Injektionsvolumen	Versuchsdg. A	28 (9b)	28 (16)	14	17	16	12	
pro Tier in ml	Versuchsdg. B)	36 (12)	36 (24)	16	19	17	10(B)	
	Versuchsdg. C)							
	Versuchsdg. D	36 (12)	36 (24)	17	21	18		
Auswahl der Applikationsstelle	i. m. Anconaeus	B	A ⁴⁾ , D	B	C	C	B ³⁾	
pro Versuchsdurchgang	s. c. Triel	A ²⁾ , D ⁴⁾	B	C	B	D	A	
	i. m. Hinterhand	C	-	D	A	B	-	
	s. c. Hals	-	C	A	D	A	-	

Besondere Bemerkungen:

- 1) Nr. 589 wird am 19.1.81 im Rahmen des Versuchsplans nach dem 2. Versuchsdurchgang (B) geschlachtet.
- 2) Bei Nr. 9b ergibt sich am 2.12.80 eine Thrombophlebitis der Katheter-Vene, die Behandlung erfolgt lokal mit Heparin-Salbe^R; am 9.1.81 weisen Nr. 9b und Nr. 589 eine erhöhte Körpertemperatur auf, die Behandlung erfolgt wie in Kapitel 3.1.4. beschrieben.
- 3) Nr. 589 weist am 15. und 16.1.81 einen schlechten Allgemeinzustand auf (Versuchsdg. B); die Behandlung erfolgt mit Effortil^R und Tonophosphan
- 4) Nach Abschluß von Versuchsdg. A werden am 14.1.81 die Tiere Nr. 12 und Nr. 24 neu in den Versuch aufgenommen, da bei Nr. 9b und Nr. 12 eine Endocarditis valvularis mit Exitus auftrat.

Tabelle 12g: Ansatz und Durchführung von Versuch Nr. 6

Präparat: Terramycin LA^R

Wirkstoff und Dosierung: Oxytetracyclin in wässriger Lösung; 20 mg /kg KGW

Versuchsdurchgänge: A: 11. 2. - 22. 2. 81 B: 11. 3. - 22. 3. 81

Versuchstier	Färse 581
Injektionsvolumen in ml	Versuchsdg. A 33 (auf 2 Stellen verteilt) Versuchsdg. B 36
Auswahl der Applikationsstelle pro Versuchs- durchgang	i. m. Anconaeus A ¹⁾ , B ²⁾

Besondere Bemerkungen:

- 1) Am 13.3. und am 21.3. konnte jeweils eine leichte Schwellung des Injektionsstellenbereichs festgestellt werden.
- 2) Nach dem 2. Versuchsdurchgang (B) wurde das Tier am 31.3.81 im Rahmen des Versuchsplans geschlachtet.

3.1.3. Behandlungsschema

Jedes der o. a. Arzneimittel wurde in vier aufeinanderfolgenden Versuchsdurchgängen an 5, 6 oder 7 Tiere, die jeweils eine Versuchsgruppe bildeten, subkutan bzw. intramuskulär an folgende Injektionsstellen verabreicht:

Intramuskulär in:

- a) die Anconaeusmuskulatur und
- b) die Hinterhandmuskulatur (Mm. gluteus, semitendineus und semimembraneus)

Subkutan:

- c) seitlich am Hals und
- d) in den Bereich des Triels.

Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen waren davon abhängig, wie lange antimikrobiell wirksame Konzentrationen im Anschluß an die Behandlung im Plasma nachweisbar waren. Mit dem nachfolgenden Versuchsdurchgang wurde stets erst dann begonnen, nachdem im Plasma mindestens 5 Tage lang keine Hemmstoffe unter Anwendung des zur Verfügung stehenden Analysenverfahrens mehr nachweisbar waren, wonach nochmals 5 Tage abgewartet wurden.

Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Versuchen (Versuche 1 - 6), die jeweilige Auswahl der Injektionsstelle, die tatsächlich verabreichte Dosis (mg/kg KGW bzw. ml Gesamtvolumen) sowie die Abstände zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen ergeben sich aus den Zusammenstellungen in den Tabellen 12 a - g. Diese Tabellen enthalten auch Angaben über etwaige Besonderheiten während des Versuchsablaufes.

Der Erfassung des Verlaufs der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma wurde das in Tabelle 13 dargelegte Schema für die zeitlichen Entnahmen der Blutproben

zugrunde gelegt. Die Entnahme der Milchproben bei den Kühen erfolgte zweimal täglich während der üblichen Melkzeiten.

Während der häufigen Blutentnahmen zu Beginn eines Versuchsdurchganges (Phasen 1 und 2, siehe Tabelle 13) konnten bei 6 bis 7 im Versuch stehenden Tieren Schwankungen der vorgesehenen Entnahmezeitpunkte von bis zu ± 5 Minuten z.T. nicht vermieden werden. Bei 4- bis 6- stündiger Entnahme bzw. bei den zweimal täglich erfolgenden Entnahmen wurden aufgrund der vorgegebenen Arbeitsabläufe (Melken, Stallreinigung usw.) Abweichungen von den vorgegebenen Entnahmezeitpunkten von 10 bis maximal 20 bzw. 30 Minuten toleriert.

Aus jedem Versuch wurde nach zwei Versuchsdurchgängen (A und B) ein Tier zur Untersuchung der Rückstandskonzentrationen am Ort der Applikation bzw. in Muskulatur und Organen geschlachtet. Der Zeitpunkt der Schlachtung wurde so gewählt, daß entweder die vom Bundesgesundheitsamt festgesetzte Wartezeit eingehalten wurde oder aber Wirkstoffe im peripheren Plasma nicht mehr nachweisbar waren.

3.1.4. Versuchsdurchführung bei akut erkrankten Tieren

Da einige der im Versuch stehenden Tier erkrankten, wurde die Gelegenheit wahrgenommen, im Zusammenhang mit den eingeleiteten therapeutischen Maßnahmen durch Erfassung der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma Hinweise auf eine möglicherweise veränderte Verfügbarkeit der Arzneimittel zu erhalten.

Das für Versuch Nr. 1 bereitstehende Kalb Nr. 271 erkrankte am 5. 3. 1980 an einer akuten, hochfieberigen Pneumonie

Tabelle 13: Zeitplan für die Entnahme der Blutproben

Kontrollphase	je 1. Probe nach Einsatz des Katheters, 1 weitere Probe unmittelbar vor Versuchsbeginn	Anzahl der Entnahmen pro Tier
Zeitpunkt 0	Behandlung	-
Phase 1 0-3 Stunden p.appl.	Entnahmen im Abstand von 20 Minuten	9
Phase 2 ab 3-6 Stunden p.appl.	Entnahmen im Abstand von 1 Stunde	3
Phase 3 ab 6-18 Stunden p.appl.	Entnahmen im Abstand von 2 Stunden	6
Phase 4 ab 18-38 Stunden p.appl.	Entnahmen im Abstand von 4 Stunden	5
Phase 5 ab 38-62 Stunden p.appl.	Entnahmen im Abstand von 6 Stunden	4
Phase 6	Entnahmen alternierend in Abständen von 12 und 14 Stunden bis mind. 5 Tage nach letztem positiven Plasmapwert	variabel

(Körpertemperatur $40,3^{\circ}\text{C}$, rektal gemessen) (siehe Tabelle 12a). Die Behandlung erfolgte mit Ampicillin "Albrecht"^R (Wirkstoff: Ampicillin-Trihydrat) subkutan in den Trierl in einer Dosierung von 15 mg/kg KGW.

Die Blutproben wurden zunächst im Abstand von 20 Minuten (3 Stunden lang), dann über weitere 4 Stunden im Abstand von 1 Stunde entnommen; die letzte Entnahme erfolgte am nächsten Morgen nach weiteren 11 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Symptome weitgehend abgeklungen (siehe Tabelle 14 a).

Die Behandlung der erkrankten Tiere Nr. 9b und Nr. 589 erfolgte mit Terramycin 100^R (Wirkstoff: Oxytetracyclin). Die Blutentnahmen wurden zunächst in ein- und später in mehrstündigen Abständen durch Punktion der Vena jugularis durchgeführt. Weitere Angaben zur Dosis, dem Ort der Applikation, den exakten Zeitintervallen zwischen den Blutentnahmen sowie zum Verlauf der Körpertemperatur finden sich in den Tabellen 14 a und b.

Tabelle 14a: Zeitplan der Blutentnahmen und Verlauf der Körpertemperatur bei dem an einer akuten Pneumonie erkrankten und mit Ampicillin-Trihydrat behandelten (15 mg/kg KGW) Kalb Nr. 271 - Injektionsstelle: Triel (s. c.)

Probe Nr.	Zeitpunkt der Blutentnahme (Stunden nach Beginn der Behandlung)	Zeitintervall Blutentnahme	Körpertemperatur
1 ¹⁾ Min.	0		40,3
2	20		40,3
3	40		
4	60		
5	80		39,4
6	100	20minütig	
7	120		
8	140		
9	160		
10	180		
11 Stunden	4		38,7
12	5		
13	6	1stündig	
14	7		38,4
15	11		38,5

1) Tageszeit = 12.00 Uhr

Tabelle 14b: Zeitplan der Blutentnahmen und Verlauf der Körpertemperatur bei den akut erkrankten und mit Oxytetracyclin behandelten Tieren Kuh Nr. 9b und Färse Nr. 589 (Dosis jeweils 5 mg/kg KGW)

Probe Nr.	Zeitpunkt der Blutentnahme (Stunden nach Beginn der Behandlung)	Kuh Nr. 9 b i.m. Anconaeus		Färse Nr. 589 s.c. Triel	
		Zeitintervall	Körpertemperatur	Zeitintervall	Körpertemperatur
1 ¹⁾	0 (Kontrolle)		41,7		40,4
2	1		41,2		40,5
3	2		40,6		40,5
4	3		40,5		41,5
5	4	1stündig	40,9	1stündig	40,8
6	5		41,1		41,1
7	6		40,9		39,9
8	7		40,8		39,8
9	14	7 Stunden	40,0	7 Stunden	39,2
10	20	6 Stunden	39,6	6 Stunden	39,7
11	24	4 Stunden	39,9	4 Stunden	39,6
12	38	2)		14 Stunden	39,4
13	47			9 Stunden	39,2
14	61			14 Stunden	39,5
15	85			24 Stunden	38,9

1) Tageszeit = 17.00 Uhr

2) Weitere Behandlung von Kuh Nr. 9 (durch die Ambulanz der Rinderklinik des Fachbereiches Veterinärmedizin).

3.1.5. Gewinnung der Blutplasma-, Milch-,
Muskulatur- und Organproben

3.1.5.1. Gewinnung und Konservierung der Blutplasma-
proben

Da insbesondere während der Anflutungsphase der Arzneimittel in relativ kurzen Abständen (siehe Tabelle 13) Blut entnommen werden mußte, erfolgte die Entnahme durch in die Vena jugularis eingebrachte Katheter (Silastic^R, Dow Corning, Cat. Nr. 602-265), die nach Punktion der Vene mit einer Hohlnadel ca. 30 cm weit vorgeschoben wurden. Das freie äußere Ende der Katheter war zwischen 30 und 60 cm lang, um bei den ohne Zwangsmaßnahmen durchgeführten Blutentnahmen den Bewegungen des Tieres folgen zu können. Der Verschuß der Katheter erfolgte durch eine abgesägte Stahlkanüle mit aufgesetztem Plastikonus. Mittels eines Halskragens aus breitem Tesaband erfolgte die Befestigung, wobei das zur Blutentnahme benötigte freie Ende durch einen aufklappbaren Teil des Bandes stets zugänglich gehalten wurde.

Nach dem Einsetzen sowie nach jeder Blutentnahme wurde der Katheter mit einer sterilen Na-Heparin enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung gespült; bei häufigen Blutentnahmen (Phasen 1 - 4, siehe Tabelle 13) lag die Heparinkonzentration bei 10 Einheiten/ml, ansonsten bei 20 Einheiten/ml.

Diese Katheter blieben z. T. über mehrere Versuchsdurchgänge funktionsfähig; lediglich bei den Kühen traten - bedingt durch die Art des Freßgitters - vermehrt Probleme auf, so daß die Katheter z. T. bereits nach wenigen Tagen entfernt werden mußten. In solchen Fällen wurden alle weiteren Blutproben durch Punktion entnommen.

Das Blut wurde in Einmalspritzen (Pharma Plast) aufgezogen und sofort in heparinisierte Plastikzentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt, Nr. 26/356) verbracht. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3000 RpM (Tischzentrifuge von Heraeus Christ) wurde das überstehende Plasma auf zwei Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt, Nr. 65/806) verteilt und bei mindestens -30° C bis zum Zeitpunkt der Untersuchung im Labor (siehe Kapitel 3.3.4.) eingefroren. Falls nicht sofort zentrifugiert werden konnte, wurden die Blutproben zunächst bis zu 2 Stunden im Kühlraum bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt. Zur Gewinnung von Serum (siehe Kapitel 3.1.1.) wurde das Blut in gläserne Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Fassungsvermögen abgefüllt, bis zu 3 Stunden im Kühlraum bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt und dann wie oben angegeben zentrifugiert.

3.1.5.2. Gewinnung und Konservierung der Milchproben

Während der Zeit eines Versuchsdurchganges wurde von den Kühen bei jedem morgendlichen und abendlichen Melken eine Milchprobe in Plastikgefäße abgefüllt, gekennzeichnet

und bei mindestens -30° C bis zum Zeitpunkt der Untersuchung (siehe Kapitel 3.3.4.) eingefroren.

3.1.5.3. Gewinnung, Konservierung und Aufarbeitung der Fleisch- und Organproben

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden folgende Proben entnommen:

- a) Injektionsstelle: die Anconaeusmuskulatur bzw. subkutanes Bindegewebe und Halsmuskulatur aus dem Bereich des Triels;
- b) Muskulatur außerhalb des Bereichs der Injektionsstelle, z. B. der gegenüber liegende M. triceps brachii oder Teile aus der Hinterhand;
- c) die Nieren;
- d) Teile der Leber und die Gallenblase;
- e) Fettgewebe, z. B. Nierenfett.

Die Gewebeproben wurden gekennzeichnet, in Plastikbeutel verpackt und nach dem Auskühlen (ca. 4 Stunden) bei mindestens -30° C eingefroren. Die Untersuchung auf antibakteriell wirksame Rückstände erfolgte spätestens eine Woche nach der Schlachtung.

Um den Bereich der Rückstände an der Injektionsstelle möglichst sicher zu erfassen, wurde wie folgt vorgegangen:

Bereits vor dem Einfrieren war der Muskel gemäß seiner Lage im Tierkörper gekennzeichnet worden. Zur Auffindung der eigentlichen Applikationsstelle wurde die Muskelpartie danach in noch halbgefrorenem Zustand in 2 bis 3 cm dicke Scheiben aufgeteilt. Nach Lokalisierung der gefundenen (Arzneimittelreste, Hämatome) oder vermuteten Injektionsstelle wurde diese sowie weitere in konzentrischen Abständen

entnommenen und gekennzeichneten Proben mit dem Hemmstofftest nach den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschauengesetz auf Arzneimittelrückstände untersucht (siehe Kapitel 3.3.4.2.).

Bei einem Teil der Gewebeproben wurde versucht, die noch vorhandenen Rückstände quantitativ zu erfassen, wozu wie folgt vorgegangen wurde: 1 g Leber und Niere wurden mit je 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung am Ultra-Turrax (Typ TP18/10) homogenisiert, bei Muskulatur wurden 2 ml physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Das Homogenisat wurde dann 10 Minuten bei 3000 RpM zentrifugiert und der Überstand, wie in Kapitel 3.3.4.4. (Agarlochtest) beschrieben, untersucht.

3.2. Prinzip der Durchführung der Hemmstoffnachweise in Fleisch, Organen, Blutplasma und Milch

Im Hinblick auf die der Arbeit zugrunde liegende Fragestellung (Bioverfügbarkeit antimikrobiell wirksamer Arzneimittel in Abhängigkeit vom Ort der Applikation) erschien es zweckmäßig, zur Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen von Anfang an mikrobiologische Verfahren anzuwenden. Aufgrund der bisher gemachten Erfahrungen bot sich dabei an, bei der Untersuchung von Fleisch, Organen, aber auch Blutplasma im Prinzip auf den von Levetzow (1971 und 1978) entwickelten und in die Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschauengesetz aufgenommenen amtlichen Hemmstofftest zurückzugreifen. Im Rahmen von Vorversuchen (siehe Kapitel 3.3.1.) mußte daher zunächst lediglich geklärt werden, inwieweit eine weitere Standardisierung des Verfahrens und die Ableitung der Zuverlässigkeit (Wiederholbarkeit, Spezifität, Genauigkeit, Empfindlichkeit) möglich ist.

Soweit dies angebracht war, kam bei der Untersuchung von Milch aufgrund seiner besonderen Eignung der Brillantschwarzreduktionstest (Routineverfahren) zur Anwendung.

3.2.1. Hemmstofftest nach den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz

Nach der Vorschrift in den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz muß die zu untersuchende Probe (Fleisch- oder Nierenstück) auf einen geeigneten, mit dem entsprechenden Nachweiskeim versetzten Nährboden (Bakterien-agarmischkultur) aufgelegt werden. Der Gewebssaft diffundiert in das Agarmedium, wobei etwa vorhandene antimikrobiell wirksame Substanzen das Wachstum des Testkeims in der Umgebung der Probe hemmen. Dies zeigt sich in einer annähernd kreisförmigen kolonienfreien Zone um das Probenstück (Levetzow 1978, Forschner 1962). Als Testkeim wird eine Sporensuspension von *Bac. subtilis* BGA vorgeschrieben. Das Ergebnis des Tests wird durch Ausmessen der Hemmzone zwischen dem Probenrand und der Wachstumsgrenze der Kolonien ermittelt (Levetzow 1971, 1978, Sjøgaard 1979, Pichnarcik et al. 1969). Hierbei gilt nach den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz eine Hemmzone von 2 Millimetern als eindeutig positiv.

3.2.2. Blättchentest

Sollen flüssige Medien wie z. B. Blutplasma auf ihren Hemmstoffgehalt untersucht werden, eignet sich der sog. Blättchentest (Coretti 1959, Kelch und Coretti 1959, Levetzow 1978, Klima 1966, Ginn et al. 1978, Sjøgaard 1979), bei dem statt einer Gewebeprobe sterile Fließpapierblättchen mit einem bestimmten Durchmesser und konstanter

Dicke mit der entsprechenden Flüssigkeit getränkt und dann auf den beimpften Nährboden aufgelegt werden. Die Größe der Hemmzone ist von der Antibiotikamenge in der aufgesogenen Flüssigkeit im Blättchen abhängig.

Zur Quantifizierung der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma wurden genauso wie bei dem unter 3.3.4.4. beschriebenen Agarlochtest Standardkurven (Verdünnungsreihen) aus den verabreichten Arzneimitteln erstellt. Zum Teil wurden auch Verdünnungsreihen mit der entsprechenden Reinsubstanz abgesetzt. Durch Vergleich der Hemmhofgröße der Probe mit denen der Eichkurve können die eventuell vorhandenen Wirkstoffe quantitativ erfaßt werden (siehe Kapitel 3.4.1.).

3.2.3. Agarlochtest

Eine weitere Modifikation zum Nachweis von Hemmstoffen in Flüssigkeiten ist der Agarlochtest. Dabei werden Löcher mit einem bestimmten Durchmesser in den mit dem entsprechenden Nachweiskeim versetzten Agarnährboden gestanzt und mit einer vorgegebenen Menge des zu untersuchenden Substrates gefüllt (Coretti 1959, Pichnarcik et al. 1969). Nach Messung der Hemmzone zwischen dem Rand des Stanzlochs und der Wachstumsgrenze der Kolonien und Vergleich mit einer entsprechenden Standardkurve ist auch hier eine Quantifizierung der Wirkstoffkonzentrationen möglich (siehe Kapitel 3.3.4.4.).

3.2.4. Brillantschwarzreduktionstest

Der Nachweis der Hemmstoffe in der Milch wurde in Anlehnung an das Routineverfahren¹⁾ (Brillantschwarzreduktionstest) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein semiquantitatives Verfahren (Kraak und Tolle 1967, Schraudy und Rauscher 1972, Balla et al. 1976, Johnson et al. 1977), dem folgendes Nachweisprinzip zugrunde liegt:

Ein mit einer standardisierten Sporensuspension des *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* beimpftes Agarmedium wird unter Zusatz eines Indikators (Brillantschwarz) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte abgefüllt. Die zu untersuchenden Proben werden ebenfalls in die mit Agarmedium beschickten Vertiefungen verbracht und nach einer Diffusionszeit im Kühlschrank relativ kurze Zeit bebrütet. Beim Bebrüten bewirken die sich vermehrenden Mikroorganismen durch Säurebildung einen Umschlag des Redoxindikators in die gelbe Reduktionsstufe. Sollten in der Probe antimikrobiell wirksame Substanzen vorhanden sein, behält der Nährboden die Farbe der blauen Oxydationsstufe bei.

3.3. Ansatz der Verdünnungsreihen

Von den unter 3.1.2. aufgeführten Arzneimitteln wurden in der Regel folgende Verdünnungsreihen hergestellt:

0,03 - 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 -
10,0 - 20,0 - 25,0 - 50,0 - 100,0 IE bzw. µg pro ml.

Das Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R enthielt entsprechend pro Verdünnungsstufe jeweils gleiche Anteile

1) Das Routineverfahren (Brillantschwarzreduktionstest) lag zur Zeit der Testdurchführung als DI-Normenentwurf zur Prüfung und Stellungnahme vor.

Penicillin und Dihydrostreptomycin (in IE bzw. μg pro ml).

Da sich das Ampicillin-Trihydrat (Präparat: Ampicillin 10%^R von A. Albrecht, Versuch Nr. 1) als schwer wasserlöslich erwies, wurde für einen großen Teil der Verdünnungsreihen Ampicillin-Na in Pulverform verwendet (Präparat: Binotal^R von Bayer AG).

Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, ergab sich im Rahmen eines Vorversuches beim Ansatz von Penicillin G-Na (Präparat: Penicillin G^R von Heyl)¹⁾, Procain Penicillin G (Präparat: Procain Penicillin "Albrecht"^R) und Procain Penicillin G in Kombination mit Benzathin Penicillin G (Präparat: Tardomyocel^R von Bayer) im selben Medium (hier: Aq. dest.) kein Unterschied hinsichtlich der Hemmhofgrößen. Es wurde jeweils der Blättchentest durchgeführt.

3.3.1. Versuche zum Ansatz von Verdünnungsreihen der verwendeten Arzneimittel in verschiedenen Medien und Festlegung auf den Blättchentest bzw. Agarlochtest

Im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe unter Verwendung von Ampicillin-Trihydrat (Präparat: Ampicillin Albrecht^R), Ampicillin-Na (Präparat: Binotal^R), Procain Penicillin G allein und in Kombination mit Benzathin Penicillin G (Präparat: Tardomyocel^R) und Dihydrostreptomycin (Präparat: Langzeitpenicillin-DHS) wurden vergleichsweise der Agarlochtest und der Blättchentest herangezogen, wobei die Verdünnungsreihen zunächst in Aq. dest. angesetzt wurden. Dabei zeigte sich, daß mit beiden Verfahren in ihrem Verlauf einander entsprechende Standardkurven erhalten wurden,

1) Das Präparat wurde ausschließlich zum Ansatz der Verdünnungsreihen verwendet.

Tabelle 15: Gegenüberstellung des Verlaufs der Standardkurven von Penicillin G-Na, Procain Penicillin G und Procain Penicillin G in Kombination mit Benzathin Penicillin G
Ansatz der Standardkurven im Blättchentest; Verdünnungsmedium: Aqua dest.

Konz. in IE/ml	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	10	12,5	25	50	b
Anzahl d. Bestimmun- gen	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
ohne Vordiffusion													
1. Penicillin	x	3,18	4,58	6,01	6,90	8,30	10,55	12,18	14,59	17,36	18,55	20,68	22,99
G-Na	S	0,25	0,23	0,14	0,15	0,34	0,18	0,30	0,42	0,19	0,29	0,30	0,11
2. Procain Pen. G	x	4,09	4,70	5,94	7,56	8,91	10,09	11,29	14,23	16,54	17,61	20,44	23,33
	S	0,38	0,19	0,48	0,05	0,29	0,26	0,32	0,18	0,13	0,31	0,29	0,03
3. Procain- u. Ben- zathin Pen. G	x	3,46	4,63	4,96	6,94	8,73	9,70	10,58	14,21	16,23	17,21	19,39	20,05
	S	0,29	0,27	0,25	0,38	0,26	0,20	0,31	0,09	0,18	0,46	0,16	0,47
1 Stunde Vordiffu- sion bei +40° C													
1. Penicillin	x	3,38	4,41	5,68	6,80	8,29	10,34	11,00	14,33	16,75	17,23	20,00	22,31
G-Na	S	0,57	0,28	0,31	0,29	0,48	0,27	0,17	0,18	0,25	0,37	0,32	0,33
2. Procain Pen. G	x	3,69	4,64	5,46	7,13	8,74	9,76	10,46	13,50	16,54	17,04	19,13	20,93
	S	0,23	0,20	0,27	0,10	0,25	0,29	0,15	0,15	0,34	0,33	0,42	0,36
3. Procain- u. Ben- zathin Pen. G	x	2,50	3,55	4,41	6,51	8,16	9,26	10,45	13,55	15,75	16,46	18,34	19,31
	S	0,17	0,47	0,19	0,19	0,30	0,30	0,42	0,18	0,15	0,09	0,17	0,59

S = Standardabweichung; x = Mittelwert; b = Steigung, errechnet nach $y = a + b \ln(x)$

wie sich aus der Darstellung des Kurvenverlaufs in den Abbildungen 7 a und 7 b sowie der Wiedergabe der Variationskoeffizienten in den Tabellen 16a bis 16e ergibt. Weiterhin zeigen die in den Tabellen 16a bis 16e aufgeführten Ergebnisse, daß - mit Ausnahme von Oxytetracyclin - für die Erfassung der überprüften Wirkstoffe annähernd dieselbe Meßgenauigkeit und Nachweisempfindlichkeit erreicht wurden.

Aufgrund der leichteren Durchführbarkeit wurde daher in allen weiteren Versuchen (außer Versuch 5 und 6 mit Wirkstoff Oxytetracyclin), da eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit gesichert werden konnte, auf den Blättchentest zurückgegriffen.

Um festzustellen, inwieweit der Verlauf der Standardkurven von der Art des Verdünnungsmediums abhängt, wurden im Rahmen dieser Vorversuche mit den verwendeten Arzneimitteln einschließlich der oxytetracyclinhaltigen Präparate Eichkurven in demineralisiertem Wasser, in physiologischer Kochsalzlösung, in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung¹⁾ und in Blutplasma angesetzt (bei letzterem handelte es sich um das Blutplasma unbehandelter Kühe) und die entsprechenden Hemmhofgrößen nach Durchführung des Blättchentests (und des Agarlochtests, bei den oxytetracyclinhaltigen Präparaten) gemessen. Das Ergebnis ist in den Tabellen 17 a - e wiedergegeben. Diese zeigen zunächst, daß bei Penicillin allein oder in Kombination mit Dihydrostreptomycin in jedem Fall bei Verwendung von demineralisiertem Wasser eine qualitativ gleichwertige Standardkurve wie nach Verwendung von Plasma als Verdünnungsmedium erhalten wurde. Auch bei Verwendung von physiologi-

1) Zusammensetzung:

NaCl	0,8 %
KCl	0,02 %
KH_2PO_4	0,012 %
Na_2HPO_4	0,091 %

Abbildung 7a:

Verlauf der Standardkurven von Procain - und Benzathin-Penicillin G im
Blättchentest und im Agarlochtest

x = Blättchentest

▲ = Agarlochtest

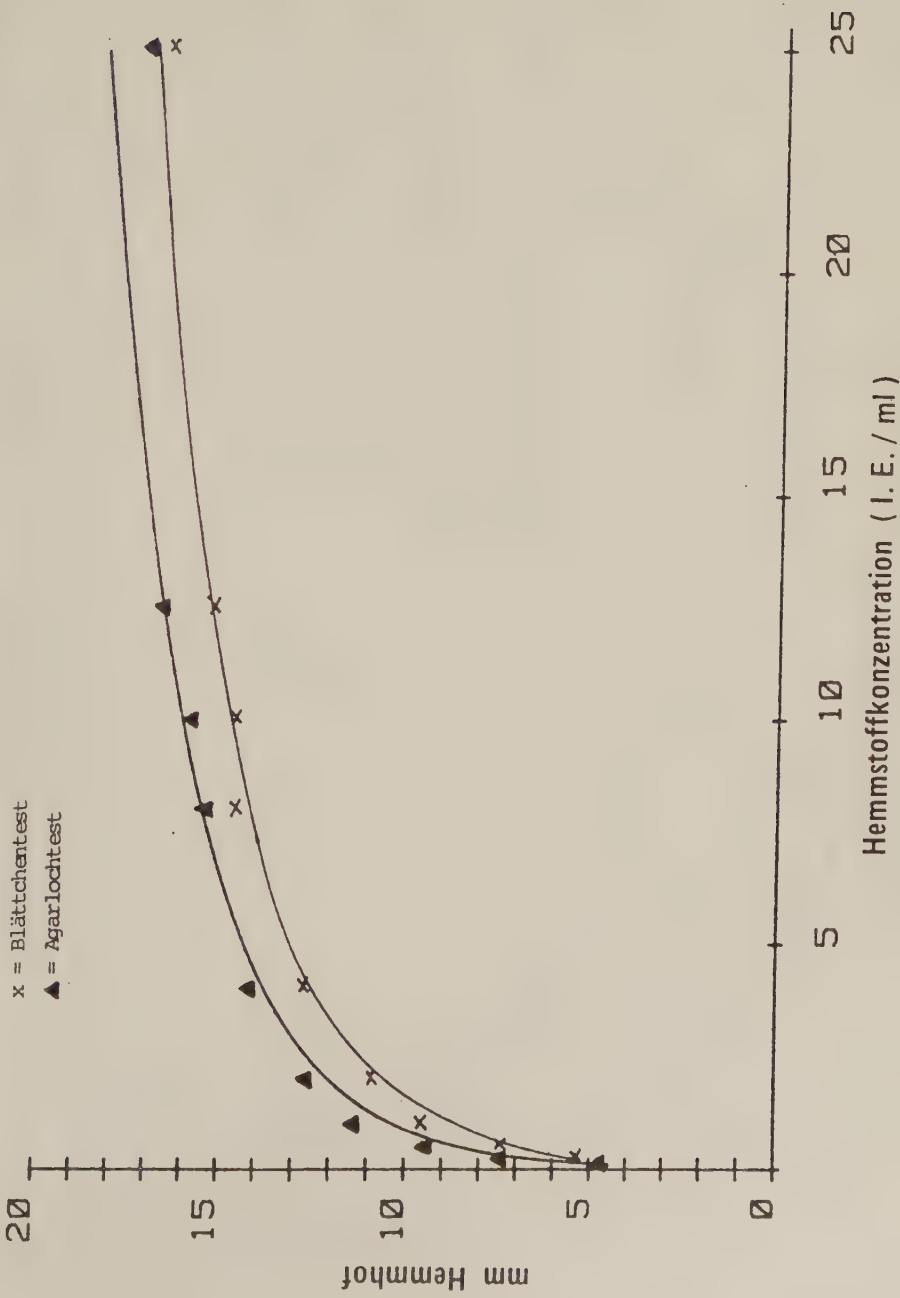


Abbildung 7 b:

Verlauf der Standardkurven von Procain Penicillin G im

Blättchentest und im Agarlochtest

x = Blättchentest

▲ = Agarlochtest

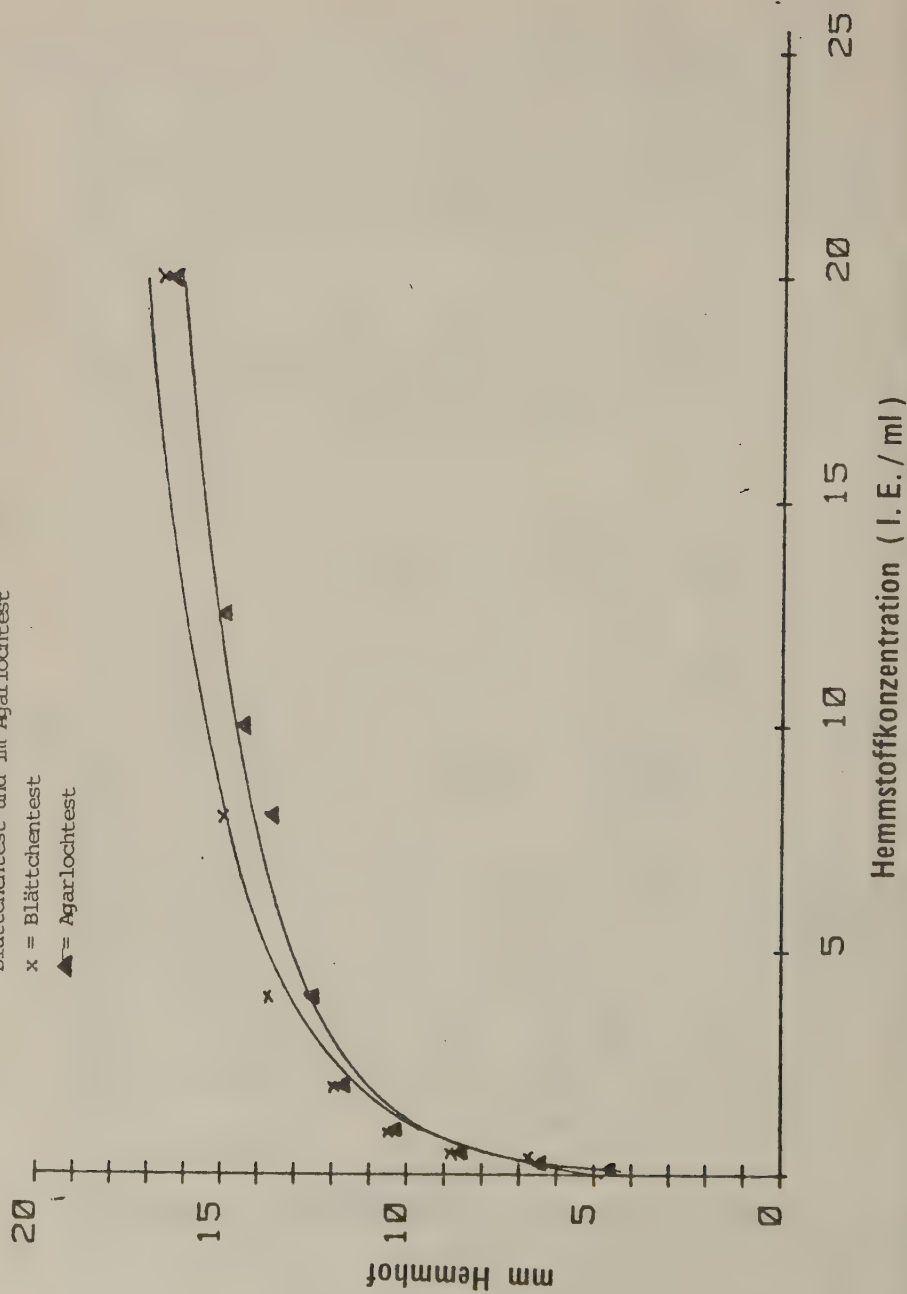


Tabelle 16b: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen (Aqua dest.) im Blättchentest (3.3.4.3.) und im Agarlochtest (3.3.4.4.)

log Regression der Standardkurven: $y = a + b \ln(x)$
 Wirkstoff: Procain Penicillin G
 Präparat: Procain Penicillin "Albrecht"^R
 $y = \text{mm Hemmhof}$
 $x = \text{Konzentration des Hemmstoffs}$

Konz. in IE bzw. µg pro ml													
		0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	b
Anzahl d. Meßpunkte	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Hemmhofdurchmesser in mm													
bei Anwendung	$\bar{x}$	2,53	4,53	6,39	8,46	10,23	11,65	12,50	13,60	14,41	14,95	16,41	
- des Agarlochtests	S	0,30	0,24	0,30	0,25	0,48	0,33	0,18	0,17	0,51	0,33	0,14	2,262
	% VK	11,86	5,30	4,69	2,96	4,69	2,83	1,44	1,25	3,54	2,20	0,85	
- des Blättchentests													
	$\bar{x}$	2,18	3,16	6,43	8,85	10,39	11,88	13,65	14,89	14,70	15,53	16,50	
	S	0,33	0,73	0,43	0,24	0,51	0,50	0,16	0,25	0,19	0,25	0,14	2,492
	% VK	15,14	23,10	6,68	2,71	4,91	4,21	1,17	1,69	1,29	1,61	0,85	

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

b = Steigung der Standardkurve

Tabelle 16c: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen (Aqua dest.) im Blättchentest (3.3.4.3.) und im Agarlochtest (3.3.4.4.)

log. Regression der Standardkurven: $y = a + b \ln(x)$

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G

Präparat: Tardomyocel pro inj. R

y = mm Hemmhof

x = Konzentration des Hemmstoffs

Konz. in IE bzw. µg pro ml	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	25	b
Anzahl d. Meßpunkte	n 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Hemmhofdurchmesser in mm	$\bar{x}$ 1,54	4,71	7,40	9,44	11,33	12,61	14,16	15,46	15,83	16,65	17,29	
bei Anwendung	S 0,27	0,34	0,15	0,14	0,25	0,06	0,29	0,09	0,17	0,23	0,17	2,532
- des Agarlochtests	%VK 17,53	7,22	2,03	1,48	2,21	0,48	2,05	0,58	1,07	1,38	0,98	
- des Blättchentests	$\bar{x}$ 2,03	3,01	5,35	7,35	9,51	10,75	12,69	14,61	14,56	15,25	16,58	
	S 0,22	0,35	0,29	0,25	0,10	0,10	0,27	0,33	0,49	0,06	0,25	2,522
	%VK 10,84	11,63	5,42	3,40	1,05	1,02	2,13	2,26	3,37	0,39	1,51	

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

b = Steigung der Standardkurve

Tabelle 16d: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen (Aqua dest.) im Blättchentest (3.3.4.3.) und im Agarlochtest (3.3.4.4.)

log. Regression der Standardkurven: $y = a + b \ln(x)$ y = mm Hemnhof
 Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G im Komb. mit x = Konzentration des Hemmstoffs
 Dihydrostreptomycin
 Präparat: Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R

Konz. in IE und µg pro ml		0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	b
Anzahl d. Meßpunkte	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Hemnhofdurchmesser in mm	$\bar{x}$	2,68	4,68	6,13	7,86	9,38	11,55	12,89	13,39	14,00	15,21		
bei Anwendung	S k. H.	0,17	0,21	0,26	0,40	0,32	0,16	0,40	0,34	0,42	0,19		2,440
- des Agarlochtests	%VK	6,34	4,49	4,24	5,09	3,41	1,39	3,10	2,54	3,00	1,25		
- des Blättchentests	$\bar{x}$	3,28	5,49	7,43	9,45	10,64	12,45	13,94	14,04	14,64	15,96		
	S k. H.	0,29	0,40	0,26	0,31	0,39	0,33	0,25	0,18	0,24	0,31		2,402
	%VK	8,84	7,29	3,50	3,28	3,67	2,65	1,79	1,28	1,64	1,94		

$\bar{x}$ = Mittelwert
 S = Standardabweichung
 VK = Variationskoeffizient
 b = Steigung der Standardkurve
 k.H. = kein Hemnhof

Tabelle 16e: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen (Aqua dest.) im Blättchentest (3.3.4.3.) und im Agarlochtest (3.3.4.4.)

log. Regression der Standardkurven: $y = a + b \ln(x)$																
y = mm Hemmhof																
x = Konzentration des Hemmstoffs																
Wirkstoff: Oxytetracyclin																
Präparat: Terramycin 100 ^R																
Konz. in IE bzw. µg pro ml	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	25	50	100	b	
Anzahl d. Meßpunkte	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Hemmhofdurchmesser																
in mm bei Anwen- dung	$\bar{x}$	1,10	1,60	2,99	5,74	7,88	9,78	11,40	11,35	12,48	13,86		15,43	17,81		
- des Agarlochtests	S	k.H.	0,12	0,21	0,42	0,30	0,34	0,22	0,41	0,29	0,27	0,18	-	0,80	0,36	2,552
	$\%K$	10,91	13,13	14,05	5,23	4,31	2,25	3,50	2,56	2,16	1,30		5,18	2,02		
- des Blättchen- tests																
	$\bar{x}$				1,41	3,06	5,50	6,88	7,89	7,91	9,11	11,31	12,54	14,61		
	S	k.H.	k.H.	k.H.	0,24	0,30	0,60	0,68	0,30	0,48	0,50	0,44	0,39	0,39	2,882	
	$\%K$				17,02	9,80	10,91	9,88	3,80	6,07	5,49	3,89	3,11	2,67		

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

b = Steigung der Standardkurve

k.H. = kein Hemmhof

scher Kochsalzlösung und phosphatgepuffertter physiologischer Kochsalzlösung konnte in der Regel keine zusätzliche Verbesserung (Empfindlichkeitssteigerung) herbeigeführt werden; z. T. wurde sogar ein Wirkungsverlust festgestellt (siehe Tabelle 17 d).

Von den untersuchten Antibiotika wies zunächst das Oxytetracyclin die geringste Empfindlichkeit auf, wobei sich auch gleichzeitig ein deutlicher Unterschied zwischen den Verdünnungsmedien Plasma und Wasser zeigte. Aufgrund der besseren Empfindlichkeit der in Plasma angesetzten Verdünnungsreihe wurde in den weiteren Versuchen auf den Agarlochtest (der auch die Einbringung einer größeren Probenmenge gestattete) sowie die Verwendung von Plasma als Verdünnungsmedium zurückgegriffen. Wie Tabelle 17 e zeigt, konnte dadurch in Einzelversuchen die Nachweisempfindlichkeit auf 0,125 µg/ml gesteigert werden.

3.3.2. Vorversuche zur Hemmung der antibakteriellen Aktivität von Penicillin mit Penicillinase

Um bei der Erfassung der antimikrobiell wirksamen Konzentrationen im Plasma (bei Durchführung von Versuch 4) selektiv auf den Dihydrostreptomycin-Anteil schließen zu können, sollte versucht werden, den gleichzeitig vorhandenen Penicillinanteil durch eine Vorinkubation mit Penicillinase zu inaktivieren.

Zur Ableitung der dazu notwendigen Penicillinasemenge wurden folgende Vorversuche durchgeführt: Penicillinase in Pulverform (Präparat: Penicillinase A^R von Kettelhack Riker Pharma GmbH; enthält 100000 Einheiten pro Ampulle) wurde in 20 ml sterilem Aq. bidest gelöst (diese Lösung war bis zu 12 Wochen bei 4⁰ C haltbar), wonach drei Ampicillin-Na (Binotal^R)-Verdünnungsreihen (0,02 - 0,2, 2,0 - 20,0 - 200,0 µg pro ml) in demineralisiertem Wasser mit

Tabelle 17a: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien

Ansatz der Standardkurven im Blättchentest

log, Regression errechnet nach $y = a + b \ln(x)$

Wirkstoff: Ampicillin-Na

Präparat: Binotal^R

Hemmstoffdurchmesser in Abhängigkeit von den Verdünnungsmedien	Konzentration in µg/ml											b
	0,06	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25	50	100		
	n 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
H ₂ O												
$\bar{x}$	1,43	5,03	6,98	8,80	10,83	12,25	14,03	15,15	17,03			
S k.H.	0,25	0,25	0,25	0,14	0,18	0,21	0,04	0,14	0,32			2,652
Plasma												
$\bar{x}$	1,73	4,68	6,45	8,81	10,08	11,68	13,25	14,73	16,50			
S k.H.	0,81	0,18	0,21	0,04	0,04	0,04	0,23	0,04	0,42			2,556
phys. NaCl												
$\bar{x}$	1,98	4,60	6,48	8,68	10,20	12,13	13,60	14,93	17,10			
S k.H.	0,04	0,14	0,32	0,04	0,07	0,18	0,64	0,32	0,28			2,624
Puffer												
$\bar{x}$		5,75		9,63		13,37	14,98					
S k.H.		0,31	-	0,35	-	0,34	0,28	-	-	-		2,679

n = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

b = Steigung der Standardkurve

k.H. = kein Hemmstoff

Tabelle 17b: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien

Ansatz der Standardkurven im Blättchentest

log. Regression errechnet nach $y = a + b \ln(x)$

Wirkstoff: Procain Penicillin G

Präparat: Procain Penicillin "Albrecht"^R

Hemmhofdurch- messer in Ab- hängigkeit von den Verdün- nungsmedien	Konzentration in IE/ml										
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20
H ₂ O	n 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	$\bar{x}$ 1,69	4,66	6,38	8,21	10,03	12,20	12,39	14,99	15,79	15,83	16,64
	S 0,28	0,35	0,27	0,38	0,10	0,75	0,77	0,09	0,21	0,30	0,29
Plasma	$\bar{x}$ 1,78	4,86	6,84	8,08	9,98	11,34	13,43	14,94	15,10	15,35	16,20
	S 0,18	0,26	0,33	0,24	0,06	0,06	0,23	0,17	0,11	0,19	0,23
phys. NaCl	$\bar{x}$ 3,00	5,44	6,98	8,88	10,55	12,39	14,20	15,80	15,96	16,04	16,54
	S 0,30	0,60	0,61	0,25	0,26	0,28	0,14	0,27	0,25	0,17	0,57
Puffer	$\bar{x}$ 2,26	5,20	7,06	8,73	10,20	11,68	13,73	14,64	14,99	15,56	16,40
	S 0,25	0,47	0,19	0,06	0,52	0,32	0,09	0,29	0,27	0,17	0,18

n = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

b = Steigung der Standardkurve

Tabelle/c: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien

Ansatz der Standardkurven im Blättchentest

log. Regression errechnet nach $y = a + b \ln (x)$

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G

Präparat: Tardomyocel pro inj.^R

	Konzentration in IE/ml															
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	25	b				
H ₂ O	n 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8					
	$\bar{x}$	1,55	4,11	5,79	7,59	9,36	11,33	13,53	14,01	14,01	15,68					
	S k.H.	0,28	0,26	0,47	0,34	0,50	0,23	0,22	0,28	0,19	0,12	2,670				
Plasma	$\bar{x}$	2,40	5,29	6,99	8,39	10,49	12,78	13,84	14,41	14,56	15,61					
	S k.H.	0,32	0,32	0,28	0,18	0,09	0,20	0,15	0,08	0,08	0,17	2,499				
phys. NaCl	$\bar{x}$	1,43	3,39	4,83	6,94	8,75	11,08	13,35	13,68	14,15	15,90					
	S k.H.	0,03	0,29	0,21	0,27	0,28	0,06	0,15	0,45	0,45	0,11	2,804				
Puffer	$\bar{x}$	2,85	3,93	5,84	7,83	9,40	10,95	12,75	13,84	14,34	16,44					
	S	0,16	0,28	0,18	0,10	0,33	0,29	0,11	0,18	0,09	0,22	2,281				

n = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

b = Steigung der Standardkurve

k.H. = kein Hemhof

Tabelle 17d: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien
 Ansatz der Standardkurven im Blättchentest

log. Regression errechnet nach $y = a + b \ln(x)$

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin

Präparat: Langzeitpenicillin - Dihydrostreptomycin^R

Hemhofdurch- messer in Ab- hängigkeit von den Verdün- nungsmedien	Konzentration in IE/ml, bezogen auf Penicillin										
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20
	n 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
H ₂ O	$\bar{x}$ 2,46	3,68	5,84	7,23	8,08	9,31	11,01	12,41	12,31	13,14	13,63
	S 0,52	0,57	0,71	1,05	0,56	0,40	0,68	0,90	0,30	0,51	0,23
Plasma	$\bar{x}$ 1,94	4,06	5,65	6,86	8,23	9,54	11,06	12,08	12,53	13,18	13,48
	S 0,45	0,14	0,20	0,19	0,30	0,21	0,20	0,09	0,17	0,06	0,38
phys. NaCl	$\bar{x}$	2,10	3,34	5,01	6,49	8,04	9,84	11,25	11,66	12,01	12,16
	S k.H.	0,11	0,36	0,11	0,37	0,41	0,15	0,42	0,37	0,11	0,15
Puffer	$\bar{x}$	1,64	3,85	5,45	7,06	8,49	10,08	11,59	11,80	12,25	13,65
	S k.H.	0,15	0,19	0,18	0,34	0,39	0,10	0,27	0,13	0,27	0,75

n = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

b = Steigung der Standardkurve

k.H. = kein Hemhof

Tabelle 17e: Verlauf der Standardkurven bei Ansatz der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien

Ansatz der Standardkurven im Blättchentest und im Agarlochtest

log Regression errechnet nach $y = a + b \ln(x)$

Wirkstoff: Oxytetracyclin

Präparat: Terramycin 100^R

Hemmhofdurch- messer in Ab- hängigkeit von den Verdün- nungsmedien	Konzentration µg/ml														b
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	8	10	12,5	20	25	50	100	
H ₂ O	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	$\bar{x}$	k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	2,43	4,33	5,40	5,68	7,19	7,66	9,71	12,05	
	S	k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	0,30	0,26	0,35	0,43	0,43	0,49	0,53	0,39	2,950
Plasma (Blätt- chentest)	$\bar{x}$	k.H.	k.H.	k.H.	1,41	3,06	5,50	6,88	7,89	7,91	9,11	11,31	12,54	14,61	
	S	k.H.	k.H.	k.H.	0,24	0,30	0,60	0,68	0,30	0,48	0,50	0,44	0,39	0,39	2,887
Plasma (Agar- lochtest)	$\bar{x}$	1,10	1,60	2,99	5,74	7,88	9,78	11,40	11,35	12,48	13,86	-	15,43	17,81	
	S	0,12	0,21	0,42	0,30	0,34	0,22	0,41	0,29	0,27	0,18	-	0,80	0,36	2,552

n = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

b = Steigung der Standardkurve

k.H. = kein Hemhof

aufsteigenden Anteilen an Penicillinase (20, 50 und 250 Einheiten pro ml Ampicillin-Verdünnung) angesetzt wurden. Eine 4. Verdünnungsreihe diente als Kontrolle.

Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde im Wasserbad bei 37° C erfolgte der Ansatz des Blättchentests (siehe 3.3.4.3.).

Nach einer 19stündigen Bebrütungsdauer konnte bei allen 3 Verdünnungsreihen mit Penicillinasezusatz keine antimikrobielle Aktivität mehr festgestellt werden, während die Kontrollverdünnungsreihe bis zur Verdünnung 0,2 µg/ml deutliche Hemmhöfe ergab.

Ein weiterer entsprechender Versuch wurde mit Procain Penicillin G "Albrecht" (Wirkstoff: Procain Penicillin G in wäßriger Zubereitung) durchgeführt, wobei beim Ansatz der Verdünnungsreihen (0,01 - 0,1 - 1,0 - 10,0 - 100,0 - 1000,0 - 3000,0 - 30000,0 IE Penicillin) bewußt relativ große Mengen an Penicillin in den Test eingebracht wurden.

Der Versuch ergab, daß bei einer Konzentration von 250 und 50 Einheiten Penicillinase pro ml Penicillin-Verdünnung in jedem Fall eine vollständige Hemmung der antimikrobiellen Aktivität erreicht wurde. Eine Konzentration von 20 Einheiten Penicillinase pro ml war jedoch bereits bei 10 IE Penicillin pro ml nicht mehr voll wirksam.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei der endgültigen Testdurchführung zur Hemmung des Penicillinanteils nach Anwendung des Kombinationspräparates (Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R) eine Konzentration von 100 Einheiten Penicillinaselösung pro ml Verdünnung bzw. Plasma als ausreichend angesehen. Dies bedeutete einen Zusatz von 0,02 ml der o. a. Penicillinaselösung auf 1 ml Verdünnung bzw. Plasma, so daß der Verdünnungseffekt vernachlässigt werden konnte.

3.3.3. Überprüfung der Haltbarkeit eingefrorener Plasma- und Milchproben

Um festzustellen, wie lange eventuell vorhandene Arzneimittelrückstände auch nach mehrmaligem Auftauen und Wiedereinfrieren in den Proben nachweisbar sind, wurden folgende Vorversuche durchgeführt:

- a) Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren von Verdünnungsreihen der verschiedenen Arzneimittel in Plasma. Die Untersuchung erfolgte wie unter 3.3.4.4. (Agarlochtest) beschrieben.
- b) Auftauen und Wiedereinfrieren von Verdünnungsreihen verschiedener Arzneimittel in Milch. Die Untersuchung erfolgte hier mit Hilfe des Brillantschwarzreduktionstests (siehe Kapitel 3.3.4.5.), dem eine semiquantitative Aussage zugrunde liegt.
- c) Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren von "Referenzproben". Dafür wurden Plasmaproben ausgesucht, bei denen aufgrund der durchgeführten Behandlungen zunächst deutlich meßbare Konzentrationen vorhanden waren. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.3.4.3. (Blättchentest) und 3.3.4.4. (Agarlochtest) beschrieben untersucht.
- d) Einmaliges Auftauen von Parallelproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Erfassung ihrer Wirkstoffkonzentrationen im Blättchentest (3.3.4.3.).

Die Ergebnisse der unter a) aufgeführten Versuche sind in den Tabellen 18 a-f zusammengefaßt. Daraus ist zu entnehmen, daß sich deutliche Unterschiede in der antibakteriellen Aktivität zwischen den überprüften Arzneimitteln zeigen. So war beim Ampicillin das Absinken der antibakteriellen Aktivität am stärksten ausgeprägt; bereits nach einer 2monatigen Gefrierkonservierung und einmaligem Auftauen ergab sich - gemessen an der Hemmhofgröße -

ein durchschnittlicher Aktivitätsverlust von 23 %. Dieser vergrößerte sich auf 36 % nach nochmaligem Einfrieren und Auftauen (siehe Tabelle 18 a).

Auch die anderen unter 3.1.2. aufgeführten überprüften penicillinhaltigen Arzneimittel (Tabellen 18 b - d) wiesen z. T. erhebliche Aktivitätsverluste bereits nach einmaligem Auftauen (bis zu 25 %) auf, die insbesondere bei den niedrigen Konzentrationen (bis 0,25 IE/ml) ausgeprägt waren.

Am stabilsten erwiesen sich die Standardkurven der beiden Oxytetracyclinpräparate; bei der zweiten Untersuchung traten im Vergleich zur ersten praktisch keine Veränderungen mehr auf.

Das Ergebnis der unter b) ausgeführten Untersuchungen zur Überprüfung der Stabilität der in Milch angesetzten Standardkurven ist in Tabelle 19 zusammengefaßt. Nach einmaligem Auftauen konnte hier bei keinem Arzneimittel ein weiterer Verlust der antimikrobiellen Aktivität nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der zu Punkt c) durchgeführten Untersuchungen (Haltbarkeit von Referenzproben) bestätigen weitgehend die bereits mit den Eichkurven erhaltenen Daten, nach denen sich das Ampicillin am instabilsten und das Oxytetracyclin am stabilsten erwies (Tabelle 20).

Die Ampicillin enthaltende Probe "Ampicillin I 271/6"¹⁾, die am 19. 1. 1980 nach erstmaligem Auftauen noch einen Hemmhof von 11,9 mm aufwies, zeigte nach mehrmaligem Auftauen einen kontinuierlichen Verlust der hemmenden Aktivität. Nach 6maligem Auftauen konnten keine Hemmstoffe mehr nachgewiesen werden. Ebenso wies die Probe "Ampicillin IV 15/4" am 28. 3. 1980 bei der ersten Untersuchung noch einen

1) Die römische Zahl bezeichnet den Versuchsdurchgang, die darauffolgende arabische das Versuchstier und die letzte den Entnahmezeitpunkt.

Tabelle 18a: Veränderung der antimikrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven im Plasma

Wirkstoff: Ampicillin-Na (Binotal ^R)													
Ansatz im Agarlochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)													
Eichpunkte	µg/ml	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	50 100
A: Eichkurve frisch ange- setzt	Hemhof k.H. (mm)	1,34	2,55	4,53	7,01	9,05	10,96	12,74	13,33	14,00	14,88	17,53	16,61 b: 2,711
B: Eichkurve erstmalig auf- getaut nach Zoonatiger Konservierung % von A bei -20° C	Hemhof k.H. (mm)	2,14	3,04	5,34	6,63	7,14	9,50	10,30	11,33	12,74	14,26	15,43	b: 2,332
	Hemhof Konservierung % von A bei -20° C	83,92	67,11	76,18	73,26	65,16	74,57	77,27	80,93	85,62	81,35	82,91	$\bar{x}(S):$ 77,14(6,71)
C: Eichkurve zum 2. Mal aufgetaut	Hemhof k.H. (mm)	0,96	2,33	4,43	4,85	6,20	8,59	9,16	10,09	11,24	13,55	15,09	b: 2,392
nach weiterer Konservierung % von A über 14 Tage bei -20° C	Hemhof Konservierung % von A	37,65	51,43	63,20	53,59	56,50	67,43	68,72	72,07	75,54	77,30	81,09	$\bar{x}(S):$ 64,05(13,11)
	Hemhof % von B	44,85	76,64	82,95	73,15	86,83	90,42	88,93	89,06	88,23	95,02	97,80	$\bar{x}(S):$ 83,08(14,58)

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 10b: Veränderung der antimikrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven in Plasma

Wirkstoff: Procain Penicillin G (Procain Penicillin "Albrecht"^R)
Ansatz im Agarlochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)

Eichpunkte	IE/ml	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	
A: Eichkurve firsch ange- setzt	Hemmhof (mm)	2,53	4,53	6,39	8,46	10,23	11,65	12,50	13,60	14,41	14,95	16,41	b: 2,262
B: Eichkurve erstmalig auf- getaut nach 2monatiger Konservierung bei -20° C	Hemmhof (mm)	1,91	3,79	5,81	8,36	9,64	10,71	11,79	13,04	13,88	14,78	15,69	b: 2,119
	Hemmhof % von A	75,49	83,66	90,92	98,82	94,23	91,93	94,32	95,88	96,88	98,86	95,61	$\bar{x}(S): 92,42(7,05)$
C: Eichkurve zum 2. Mal aufgetaut	Hemmhof (mm)	k.H.	1,71	2,74	6,33	8,75	10,65	11,34	13,04	13,45	14,41	15,68	b: 2,344
nach weiterer Konservierung über 14 Tage	Hemmhof % von A		37,75	42,88	74,82	85,53	91,42	90,72	95,88	93,34	96,39	95,55	$\bar{x}(S): 80,43(22,12)$
bei -20° C	Hemmhof % von B		45,12	47,16	75,72	90,77	99,44	96,18	100,0	96,90	97,50	99,94	$\bar{x}(S): 84,87(21,66)$

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemmhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 18c: Veränderung der antimikrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven in Plasma

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G (Tardomyocel pro inj.^R)

Ansatz im Agarlochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)

Eichpunkte	IE/ml	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	
A: Eichkurve frisch ange- setzt	Hemhof (nm)	2,89	5,61	8,10	10,00	11,68	13,54	15,03	16,46	16,61	17,44	18,65	b: 2,584
B: Eichkurve erstnals auf- getaut nach 2monatiger Konservierung % von A bei -20° C	Hemhof (nm)	k.H.	3,01	5,30	7,63	9,29	10,71	13,29	14,73	15,36	15,10	15,80	b: 2,340
	Hemhof % von A		53,65	65,43	76,30	79,54	79,10	88,42	89,49	92,47	86,58	84,72	$\bar{x}(S)$: 79,57(12,03)
C: Eichkurve zum 2. Mal aufgetaut nach weiterer Konservierung % von A über 14 Tage bei -20° C	Hemhof (nm)	k.H.	2,54	4,83	7,20	8,63	11,04	12,50	14,29	14,88	15,18	15,68	b: 2,306
	Hemhof % von A		45,28	59,63	72,00	73,89	81,54	83,54	86,82	89,58	87,04	84,08	$\bar{x}(S)$: 76,34(14,17)
	Hemhof % von B		84,39	91,13	94,36	92,86	103,08	94,06	97,01	96,88	100,53	99,24	$\bar{x}(S)$: 95,35(5,31)

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 18d: Veränderung der antimikrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven in Plasma

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin

Ansatz im Agarlochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)

Eichpunkte IE u. µg/ml	0,060	1,25	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	50
A: Eichkurve frisch ange-	1,53	4,89	6,80	8,44	10,80	12,81	13,94	15,00	15,19	15,75	17,48	18,60
setzt												b: 2,457
B: Eichkurve erstmals auf-	k.H.	2,39	4,59	6,26	9,24	11,00	12,35	13,59	14,59	14,53	15,95	17,53
getaut nach												b: 2,458
2monatiger												$\bar{x}(S):$
Konservierung % von A	48,88	67,50	74,17	85,56	85,87	88,59	90,60	96,05	92,25	91,24	93,01	84,07 (14,18)
bei -20° C												
C: Eichkurve zum 2. Mal	k.H.	2,01	4,35	5,71	8,91	10,20	12,01	13,13	14,68	15,63	15,74	16,64
aufgetaut												b: 2,431
nach weiterer												$\bar{x}(S):$
Konservierung % von A	41,10	63,97	67,65	82,50	79,66	86,15	87,53	96,64	99,24	90,06	89,46	80,36 (16,91)
über 14 Tage												$\bar{x}(S):$
bei -20° C												95,90 (5,85)
Hemmhof % von B	84,10	94,77	91,21	96,43	92,73	97,25	96,62	100,62	107,57	98,68	94,92	

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemmhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 18e: Veränderung der antinkrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven in Plasma

Wirkstoff: Oxytetracyclin (Terramycin 100)

Ansatz im Agarlochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)

Eichpunkte	$\mu\text{g/ml}$	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	25	50	100
A: Eichkurve														
frisch ange-	Hemhof													
setzt	(mm)													
	k.H.	1,83	3,54	6,90	8,98	10,98	12,68	12,88	14,01	15,05	15,38	16,79	17,95	b: 2,759
B: Eichkurve														
erstmalig auf-	Hemhof													
getaut nach	(mm)													
	k.H.	1,79	2,79	5,94	8,24	9,94	11,90	12,61	12,78	13,35	14,30	15,95	17,12	b: 2,655
2monatiger	Hemhof													
Konservierung	% von A													
bei -20° C		97,81	78,81	86,09	91,76	90,53	92,39	97,90	91,22	88,64	92,98	95,00	95,38	$\bar{x}(S)$: 91,54 (5,31)
C: Eichkurve														
zum 2. Mal	Hemhof													
aufgetaut	(mm)													
nach weiterer	k.H.	1,63	2,90	5,93	8,51	10,10	10,91	11,55	12,81	12,91	13,99	15,31	16,70	b: 2,539
Konservierung	% von A													
über 14 Tage		89,07	81,92	85,94	94,77	91,99	84,70	89,67	91,43	85,78	90,96	91,19	93,04	$\bar{x}(S)$: 86,34 (10,69)
bei -20° C	Hemhof													
% von B		91,06	103,94	99,83	103,28	101,61	91,68	91,59	100,23	96,70	97,83	95,99	97,55	$\bar{x}(S)$: 97,62 (4,45)

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 18f: Veränderung der antimikrobiellen Aktivität durch Einfrieren und Auftauen von Standardkurven in Plasma

Wirkstoff: Oxytetracyclin (Terramycin I^a)^R

Ansatz im Agar Lochtest (siehe Kapitel 3.3.4.4.)

Eichpunkte $\mu\text{g/ml}$	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12,5	20	25	50	100
A: Eichkurve frisch ange- setzt	k.H. 1,76 3,54 6,21 8,88 10,85 12,18 13,00 13,64 14,63 14,81 16,65 18,95 b: 2,775												
B: Eichkurve erstmalig auf- getaut nach 2monatiger Konservierung bei -20° C	k.H. 2,18 3,10 5,94 8,16 9,90 11,88 12,45 12,70 13,93 14,20 15,71 16,95 b: 2,589 123,86 87,57 95,65 91,89 91,24 97,54 95,77 93,11 95,22 95,88 94,35 89,45 $\bar{x}(s):$ 95,96(9,26)												
C: Eichkurve zum 2. Mal aufgetaut nach weiterer Konservierung über 14 Tage bei -20° C	k.H. 1,74 2,78 5,79 7,98 9,40 11,66 12,23 12,24 13,34 13,66 15,15 16,40 b: 2,541 98,86 78,53 93,24 89,86 86,63 95,73 94,08 89,74 91,18 92,23 90,99 86,54 $\bar{x}(s):$ 90,64(5,19)												
Hemhof % von B	79,82 89,68 96,97 97,79 94,95 98,15 98,23 96,38 95,76 96,20 96,44 96,76 $\bar{x}(s):$ 94,76(5,22)												

b = Steigung der Kurve, berechnet nach $y = a + b \ln(x)$

$\bar{x}$ = Mittelwert

S = Standardabweichung

k.H. = kein Hemhof

Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 8

Tabelle 19: Stabilität der antimikrobiellen Aktivität der unteren Konzentrationsstufen eingefrorener und wiederaufgetauter Standardkurven der unter 3.1.2. aufgeführten Arzneimittel (außer Terramycin LA^R) in Milch

+ = kein Farbumschlag (positive Reaktion)						
- = Farbumschlag (negative Reaktion)						
Anzahl der Bestimmungen (n) pro Eichpunkt: 3						
Wirkstoffe	Zeitspanne d. Gefrierkonser- vierung b. zum 1. Auftauen	Konz. in IE bzw. µg pro ml : 0,006 0,0125 0,025 0,05 0,1	Zeitspanne d. Gefrierkonser- vierung b. zum 2. Auftauen	Konz. in IE bzw. µg pro ml : 0,006 0,0125 0,025 0,05 0,1		
Ampicillin- Trijhydrat	12 Monate	-	+	+	+	+
					14 Tage	+
Procain Peni- cillin G	12 Monate	-	+	+	+	+
					14 Tage	+
Procain- und Benzathin Pen.	12 Monate	-	-	+	+	+
					14 Tage	+
Procain- u. Ben- zathin Pen. G in Komb. mit DHS	12 Monate	-	-	+	+	+
					14 Tage	+
Oxytetracyclin	2 Monate	-	-	+	+	+
					14 Tage	+

Hemmhof von 6,1 mm auf, während bei allen darauffolgenden Untersuchungen keine Rückstände mehr nachzuweisen waren.

Geringere, doch ebenfalls deutliche Abnahmen in ihrer antimikrobiellen Aktivität zeigten die Procain Penicillin G enthaltenden Proben "Procain Pen. G II 218/13" und "Procain Pen. G III 216/11".

Bei den Procain und Benzathin Penicillin G (II 581/11) und Oxytetracyclin(II 232/18 u.233/16) enthaltenden Proben konnte keine Abnahme der Aktivität nachgewiesen werden, während die Procain Penicillin G, Benzathin Penicillin G und Dihydrostreptomycin enthaltende Probe eine deutliche und rasche Abnahme zeigt. Mit Zusatz von Penicillinase wurden hier bereits bei der zweiten Untersuchung keine Hemmstoffe mehr nachgewiesen.

Bei der endgültigen Testdurchführung wurde aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche darauf geachtet, daß nur einmal aufgetaute Proben zur Untersuchung herangezogen wurden, da insbesondere die Ampicillin, aber auch die Procain und Benzathin Penicillin G enthaltenden Proben bereits nach zweimaligem Auftauen z. T. erhebliche Verluste der antimikrobiellen Aktivität aufwiesen.

Tabelle 21 gibt die Ergebnisse der unter Punkt d) durchgeführten Untersuchungen wieder, in denen Plasmaparallelen zum gleichen Zeitpunkt bei -20°C eingefroren wurden, die Wirkstoffkonzentrationen allerdings nach einmaligem Auftauen, jedoch zu getrennten Zeitpunkten bestimmt wurden.

Das Ampicillin ebenso wie die Kombination Procain- und Benzathin Penicillin G zeigen nach einer um 2 Monate verlängerten Lagerdauer (Gefrierkonservierung) keine weiteren Aktivitätsverluste. Beim Procain Penicillin G konnte

jedoch bei der Kuh Nr. 7 ein Verlust von ca. 25 % nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde im Fall von Wiederholungsmessungen stets die jeweils zweite eingefrorene Probe herangezogen.

Alle Proben (außer den Wiederholungen) wurden innerhalb eines Monats nach der Gewinnung und Konservierung untersucht. Zudem wurde die Auftautemperatur im Wasserbad von 30° C nicht überschritten.

3.3.4. Testdurchführung

3.3.4.1. Besondere Materialien und Reagenzien

a) Zusammensetzung des Testagars:

Der Testnährboden hatte folgende Zusammensetzung:

Fleischpepton	3,45 g
Caseinpepton	3,45 g
NaCl	5,1 g
Agar	13 g
Aq. bidest ad	1000 ml

Da in jedem Fall das verabreichte Medikament bekannt war, wurde für den Nachweis der Penicilline und Tetracycline der pH-Wert des Nährbodens auf 6 eingestellt, während zur Untersuchung auf Dihydrostreptomycin ein Nährboden mit einem pH von 8 verwendet wurde. Der Nährboden wurde entweder in flüssigem Zustand von der Nährbodenküche des Robert-Koch-Instituts bezogen oder nach Aufbewahren im Kühlraum (+ 4° C) im Sterilisator bei ca. 150° C verflüssigt und im Wasserbad bis zur Zugabe der Sporensuspension auf 56° C abgekühlt.

Tabelle 20: Hemmhofgrößen (mm) nach mehrmaligen Auftauen der gleichen Plasmaprobe

Wirkstoff (e) (Versuch Nr.)	Probe Nr.	Zeitspanne (Tage) d. Gefrierkonser- vierung b. zum 1. Auftauen	Auftauzeitpunkte						
			1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin- Trihydrat	Amp. IV15/4	18	6,1 $\frac{1}{2}$ /0 ²⁾	3 ¹⁾ /19	-/236	-/360	-/390		
	Amp. I271/6	15	11,10/0	10,13/120	9,76/121	7,51/136	4,23/154	-/244	-/428
Procain- Penicillin G	Proc. III 216/11	10	7,25/0	6,61/19	4,73/236	4,09/360			
	Proc. II 218/13	3	15,06/0	14,41/120	12,62/121	8,55/136	9,00/154		
Proc.- u. Ben- zathin Pen. G	Tardo II 581/11	20	6,30/0	5,80/19	6,25/236	5,93/360			
Proc.- u. Ben- zathin Pen. G	LPD II 219/4	21	4,03/0	1,93/19	-/236	-/360	O.P.		
u. DHS			4,36/0	-/19	-/236	-/360	m.P.		
Oxytetracyclin	Ter. II 233/16	5	4,20/0	4,11/61					
	Ter. II 232/18	5	3,61/0	4,00/60					

1) Hemmhofgröße in mm

2) zeitl. Abstand in Tagen zum ersten Auftauen

O.P. = ohne Penicillinase
m.P. = mit Penicillinase

3) - = keine hemmende Aktivität mehr nachweisbar

Tabelle 21: Untersuchungen zum Wirkstoffverlust in Parallelproben von insgesamt 6 Tieren nach jeweils einmaligem Auftauen (Angaben in Prozent)

Wirkstoff	Ampicillin	Proc. Penicillin G	Proc.-u. Benzathin Pen. G
Versuchsdurchgang	B	B	B
Tier Nr.	Kalb 232	Kuh 15	Färse 219
	Kalb 231	Kuh 7	Kuh 28
1 Probenreihe	Lagerung	14 Tage	14 Tage
	n	10	23
	Konz.	100 %	100 %
		100 %	100 %
2. Probenreihe	Lagerung	2 Monate	2 Monate
	x	105,52 %	89,29 %
	S	17,56	18,70
		105,60 %	89,29 %
		18,58	23,24

n = Anzahl der Proben

x Konz. = Mittelwert der prozentualen Anteile der 2. Probenreihe (1. Probenreihe = 100 %)

S = Standardabweichung

b) Herstellen der Sporensuspension:

Zur Anzüchtung der Sporensuspension wurde der unter a) aufgeführte Nährboden (Testagar) auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ eingestellt, in sterile Roux-Flaschen abgefüllt und mit einer reinen Sporensuspension (Keimdichte 10^7 pro ml) von *Bac. subtilis* BGA oder mit in Herz-Hirn-Bouillon angezüchteten Keimen beimpft (1 bzw. 2 ml des Inokulums pro Flasche). Die so beschickten Roux-Flaschen wurden mit paraffingetränkten Zellstoffstopfen verschlossen und 10 Tage bei $+30^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Danach erfolgte eine Abschwemmung der gewachsenen Keime mit steriler physiologischer Kochsalzlösung. Die Suspension wurde zweimal bei 3000 U/Minute 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgekippt und verworfen und das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine 30minütige Erhitzung im Wasserbad bei $+70^{\circ}\text{C}$, um die vegetativen Formen abzutöten.

Von der so erhaltenen Sporensuspension wurde auf unbeimpften Nährbodenplatten bzw. auf Isoagarplatten eine Keimzählung durchgeführt und die Suspension auf eine Dichte von 10^7 Sporen pro Milliliter eingestellt.

c) Herstellen der Testplatten und Inkubation:

Nach Erreichen der Temperatur von 56°C und nochmaliger Überprüfung des pH-Wertes (s. Punkt a) wurden zu 0,1 Liter Nährboden 1,5 ml (bei pH 6) bzw. 0,5 ml (bei pH 8) der eingestellten Sporensuspension von *Bac. subtilis* BGA zugegeben. Nach sorgfältiger Durchmischung wurde der noch flüssige Nährboden in sterile Plastikpetrischalen ausgegossen.

Die verwendeten Petrischalen hatten einen Innendurchmesser von 8,5 cm. In jede Schale wurden genau 12 ml des Nährbodens ausgegossen; das ergibt eine Agarschichtdicke von 2 mm. Während des Gießens und bis zum Erstarren des Nährbodens wurden die Platten auf einem speziellen in die Waage ausgerichteten Ausgießtisch belassen. Vor der weiteren Verwendung der Platten wurden diese noch

einen Tag lang im Kühlschrank aufbewahrt. Platten, die älter als 1 Tag waren, wurden nicht mehr verwendet. Die so hergestellten Platten wurden sowohl für den Hemmstofftest nach AB.A (siehe 3.3.4.2.) als auch für den Blättchentest (siehe 3.3.4.3.) und den Agarlochtest (siehe 3.3.4.4.) verwendet. Die Bebrütungsdauer lag bei 19 Stunden, die Bebrütungstemperatur bei $+30^{\circ}\text{C}$.

3.3.4.2. Durchführung des Allgemeinen Hemmstofftests

Die zu untersuchenden Fleisch- und Organproben wurden in Anlehnung an die Angaben der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz auf Hemmstoffe untersucht.

Die Proben wurden nach kurzfristiger Lagerung bei -30°C (siehe Kapitel 3.1.5.3.) 1 Tag vor der Durchführung des Tests bei Kühlschranktemperatur aufgetaut.

Aus allen zu entnehmenden Geweben wurden zwischen 4 bis maximal 16 zylindergroße Stücke (ca. $8 \times 2\text{ mm}$) ausgestanzt und zu je 2 bzw. 3 Stück auf die vorbereiteten Testplatten (siehe Kapitel 3.3.4.1.) aufgelegt und bebrütet.

3.3.4.3. Blättchentest

Filterpapierblättchen mit einem Durchmesser von 8 mm (601/2 Fa. Schleicher und Schüll) wurden mit einer Pinzette in die zu untersuchenden Plasmaproben bzw. in die Eichverdünnungen der unter 3.1.2. genannten Arzneimittel (Versuch 1 bis 4) eingetaucht und nach vollständigem Durchtränken auf die beimpften Nährbodenplatten (siehe Kapitel 3.3.4.1.) aufgelegt.

Das Plasma war zuvor bei $+30^{\circ}$ C im Wasserbad aufgetaut worden (siehe auch Kapitel 3.3.3.).

Auf jede Schale wurden 4 Filterpapierblättchen wie folgt aufgelegt:

- a) eine negative Kontrolle (getränkt mit Aqua dest. oder dem Plasma eines unbehandelten Tieres),
- b) eine positive Kontrolle (Eichpunkt im Bereich von 0,25 bis 12,5 IE bzw. $\mu\text{g/ml}$,
- c) eine Probe im Doppelansatz.

Soweit bei den Proben, die unmittelbar im Anschluß an die Behandlung entnommen worden waren, mit Wirkstoffkonzentrationen im Plasma außerhalb des Bereichs der Eichkurve gerechnet werden mußte, wurden diese vor der Untersuchung je nach Erwartungswert mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2, 1:3 oder 1:5 verdünnt. Proben, die aus den Entnahmephasen 4 bis 6 stammten (siehe Tabelle 13), wurden nur unverdünnt angesetzt. Bei allen Proben, die das Kombinationspräparat Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R enthielten, erfolgte eine weitere Untersuchung unter Zugabe von Penicillinase (siehe Kapitel 3.3.2.) zur selektiven Erfassung des Dihydrostreptomycins.

3.3.4.4. Agarlochtest

Mit einem Korkbohrer von 12 mm Außendurchmesser wurden pro Platte vier Löcher in den beimpften Nährboden gestanzt. Danach wurden 0,2 ml unbeimpfter Nährboden in die ausgestanzten Löcher eingefüllt, so daß Mulden gebildet wurden, in die je 0,1 ml des zu untersuchenden "Substrats" eingefüllt wurden.

Die Agarstanzlöcher wurden wie folgt beschickt:

- a) 0,1 ml einer negativen Kontrolle (Plasma eines unbehandelten Tieres),
- b) 0,1 ml einer positiven Kontrolle (Eichpunkt im Bereich von 1 bis 4 $\mu\text{g/ml}$,
- c) je 0,1 ml einer Probe im Doppelansatz.

Da mit diesem Test lediglich Oxytetracyclin erfaßt wurde, erwies sich aufgrund dessen relativ geringer Wirksamkeit (im Vergleich zu den anderen überprüften Proben) eine weitere Verdünnung von Plasmaproben als nicht notwendig.

3.3.4.5. Brillantschwarzreduktionstest

Der Nachweis der Hemmstoffe in der Milch wurde in Anlehnung an den Brillantschwarzreduktionstest (Routineverfahren) durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.4.). Der dabei verwendete Nährboden hatte folgende Zusammensetzung:

Fleischextrakt	1,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
Caseinpepton	4,0 g
Fleischpepton	6,0 g
Glukose	1,0 g
Agar	10 - 15 g
Aq. dest. ad	1000 ml

Als Indikator wurden 10 mg Brillantschwarz (Coulour Index II, Vol. 3, 3226, Nr. 27260, 1956) mit 0,2 ml Glycerin zugegeben. Der pH-Wert betrug 6,5. Der verflüssigte, im Wasserbad auf 55° C abgekühlte Nährboden wurde mit dem in sterilem Aqua dest. suspendierten Sporenyophilisat¹⁾ versetzt und nach sorgfältigem Mischen zu je 0,1 ml in die

1) Das Lyophilisat wurde von Dr. Hamann (Bundesgesundheitsamt) zur Verfügung gestellt. Es stammte aus der Milchforschungsanstalt in Kiel.

Vertiefungen der Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen pro Platte) eingefüllt. Das Agarmedium wies eine Sporendichte von ca. 10^8 Keimen pro ml auf. Zur Aufbewahrung wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm verschlossen. Die zu untersuchenden Milchproben wurden bei $+30^{\circ}$ C aufgetaut und vor der Probenentnahme nochmals gut gemischt.

Die Platten wurden wie folgt beschickt:

24 Vertiefungen dienten jeweils zur Aufnahme (0,1 ml) der Standardverdünnungsreihe (Dreifachansatz). Pro Milchprobe wurden 3mal 0,1 ml in drei weitere Vertiefungen eingebracht, wobei - um bei den Penicillin enthaltenden Proben auf unspezifische Reaktionen schließen zu können - einem der 3 Ansätze 5000 Einheiten Penicillinase (= μ l) zugesetzt wurden.

Nach 1 Stunde Diffusionszeit im Kühlschrank ($+4^{\circ}$ C) wurde das Probenmaterial durch Umdrehen der Mikrotiterplatte entleert, diese wieder mit Klebefolie oder Parafilm verschlossen und im Wasserbad bei $+60^{\circ}$ C während 2 1/2 Stunden bebrütet.

3.4. Auswertung der Untersuchungen und Bestimmung der Zuverlässigkeit

3.4.1. Auswertung des Hemmstofftests, des Blättchentests und des Agarlochtests

Nach dem Bebrüten wurden unter einem Ablesegerät (Fisher Lilly Nr. 290) die Ausdehnungen der Hemmzonen zwischen dem Rand der Gewebeprobe (siehe 3.3.4.2.) bzw. des Filterpapierblättchens (siehe 3.3.4.3.) oder des Agarstanzlochs (siehe 3.3.4.4.) und der Wachstumsgrenze des Nachweiskeims ausgemessen; pro Einzelansatz wurden zwei Meßwerte festgehalten, so daß sich für die im Doppelansatz untersuchte Probe insgesamt vier Ablesewerte ergaben.

Bei der Untersuchung von Fleisch- und Organproben wurde das Ergebnis dann als negativ bewertet, wenn - entsprechend den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz - die Hemmzonen weniger als 2 mm betrugen. Bei Untersuchung von Plasmaproben (siehe Kapitel 3.3.4.3. und 3.3.4.4.) wurde das Ergebnis erst dann als negativ bewertet, wenn Hemmzonen als solche nicht mehr eindeutig zu identifizieren waren.

Bei jeder Inkubation wurden unabhängig von der zu untersuchenden Probenzahl Eichkurven der entsprechenden Arzneimittel parallel zum Versuchsansatz erstellt (siehe Kapitel 3.3.1.).

Die ermittelten Hemmkurven konnten entsprechend der folgenden Gleichung dargestellt werden:

$$y = a + b \ln(x),$$

wobei:

y = mm Hemmhof

x = Hemmstoffkonzentration

a = Schnittpunkt mit der y-Achse

b = Steigung der Geraden.

Über ein speziell dazu entwickeltes Programm für einen HP 9825A Tischcomputer mit Schreiber und Plotter wurden sowohl die üblichen Kenngrößen wie Stichprobenkorrelationskoeffizient, Restvarianz und Vertrauensbereich ermittelt, als auch der Kurvenverlauf in: eine lineare Funktion umgewandelt.

Kurvenverlauf und Computerausdruck sind für 5 verschiedene Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkonzentrationen in den Beispielen in den Abbildungen 8 a bis 8 e wiedergegeben.

Die Auswertung der biologischen Proben erfolgte ebenfalls anhand dieses Rechenprogramms, wobei nach Eingabe des für jede Probe ermittelten Hemmstoff-Ablesewertes der zugehö-

rige x-Wert (Konzentrationsangabe) mit den entsprechenden statistischen Angaben (95 % Vertrauensbereich) ausgedruckt wurde. Bei einer Abweichung der beiden erhaltenen Werte (Doppelbestimmung) von mehr als 20 % wurde die Probe nochmals untersucht.

3.4.2. Auswertung des Brillantschwarzreduktionstests

Beim Brillantschwarzreduktionstest (siehe Kapitel 3.3.4.5.) erfolgte eine semiquantitative Auswertung.

Ein Umschlag des Indikators in die gelbe Reduktionsstufe wurde als negatives Ergebnis gewertet, während das Ausbleiben des Bakterienwachstums - sichtbar an einem Ausbleiben des Farbumschlags - als positives Ergebnis angesehen wurde. Als schwach positiv wurden solche Proben eingestuft, bei denen ein Farbumschlag nur z. T. zu erkennen war (z. B. bei der Untersuchung von tetracyclinhaltigen Proben). Anhand der parallel angesetzten Eichkurven wurde für jede Mikrotiterplatte die untere Nachweisgrenze ermittelt.

3.4.3. Bestimmung der Zuverlässigkeit

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeit der angewandten Verfahren wurden die Kriterien Richtigkeit und Präzision sowie die Grenze der unteren Nachweisbarkeit überprüft.

a) Richtigkeit und Präzision:

Angaben hierzu ergeben sich zunächst aus dem Verlauf der Standardkurven (Dosis-Wirkungsbeziehungen). Unabhängig von der Art des verwendeten Arzneimittels ergab sich aus insgesamt 70 Kurven ein durchschnittlicher Stichprobenkorrelationskoeffizient von $0,992 \pm 0,008$.

Tabelle 22 a: Zusammenfassung der positiven Kontrollen aus
den Versuchen 1-3

Versuch 1: Ampicillin-Na und -Trihydrat

Vorgabe (µg/ml)		0,5	1,0	2,0
Wiederfindung	n	12	12	3
	$\bar{x}$	0,44	1,01	1,88
	SD	0,06	0,13	0,53
	VK	0,14	0,13	0,28
	%WF	88,0	101,0	94,0

Versuch 2: Procain Penicillin G

Vorgabe (IE/ml)		0,25	0,5	1,0
Wiederfindung	n	14	14	13
	$\bar{x}$	0,25	0,52	1,00
	SD	0,03	0,10	0,18
	VK	0,12	0,19	0,18
	%WF	100,0	104,0	100,0

Versuch 3: Procain- und Benzathin Penicillin G

Vorgabe (IE/ml)		0,25	0,50	1,0
Wiederfindung	n	6	10	4
	$\bar{x}$	0,27	0,47	1,01
	SD	0,04	0,09	0,18
	VK	0,15	0,19	0,18
	%WF	108,0	94,0	101,0

$\underline{n}$ = Anzahl der Bestimmungen

$\underline{x}$ = Mittelwert

SD= Standardabweichung

VK= Variationskoeffizient

%WF= %Wiederfindung

Tabelle 22 b: Zusammenfassung der positiven Kontrollen aus
den Versuchen 4-6

Versuch 4: Dihydrostreptomycin (Ansatz mit Penicillinase)

Vorgabe ($\mu\text{g/ml}$)		4,0	8,0	12,5
Wiederfindung	n	2	2	3
	$\bar{x}$	3,85	6,10	16,77
	SD	0,68	0,43	0,06
	VK	0,18	0,07	0,004
	%WF	96,3	76,3	134,2

Versuch 5: Oxytetracyclin

Vorgabe ($\mu\text{g/ml}$)		1,0	2,0	4,0
Wiederfindung	n	2	6	3
	$\bar{x}$	0,90	2,09	4,31
	SD	0,01	0,39	0,60
	VK	0,01	0,19	0,14
	%WF	90,0	104,5	107,8

Versuch 6: Oxytetracyclin-Langzeitpräparation)

Vorgabe ($\mu\text{g/ml}$)		1,0	2,0
Wiederfindung	n	12	26
	$\bar{x}$	1,08	2,54
	SD	0,11	0,36
	VK	0,10	0,14
	%WF	108,0	127,0

$\bar{n}$ = Anzahl der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

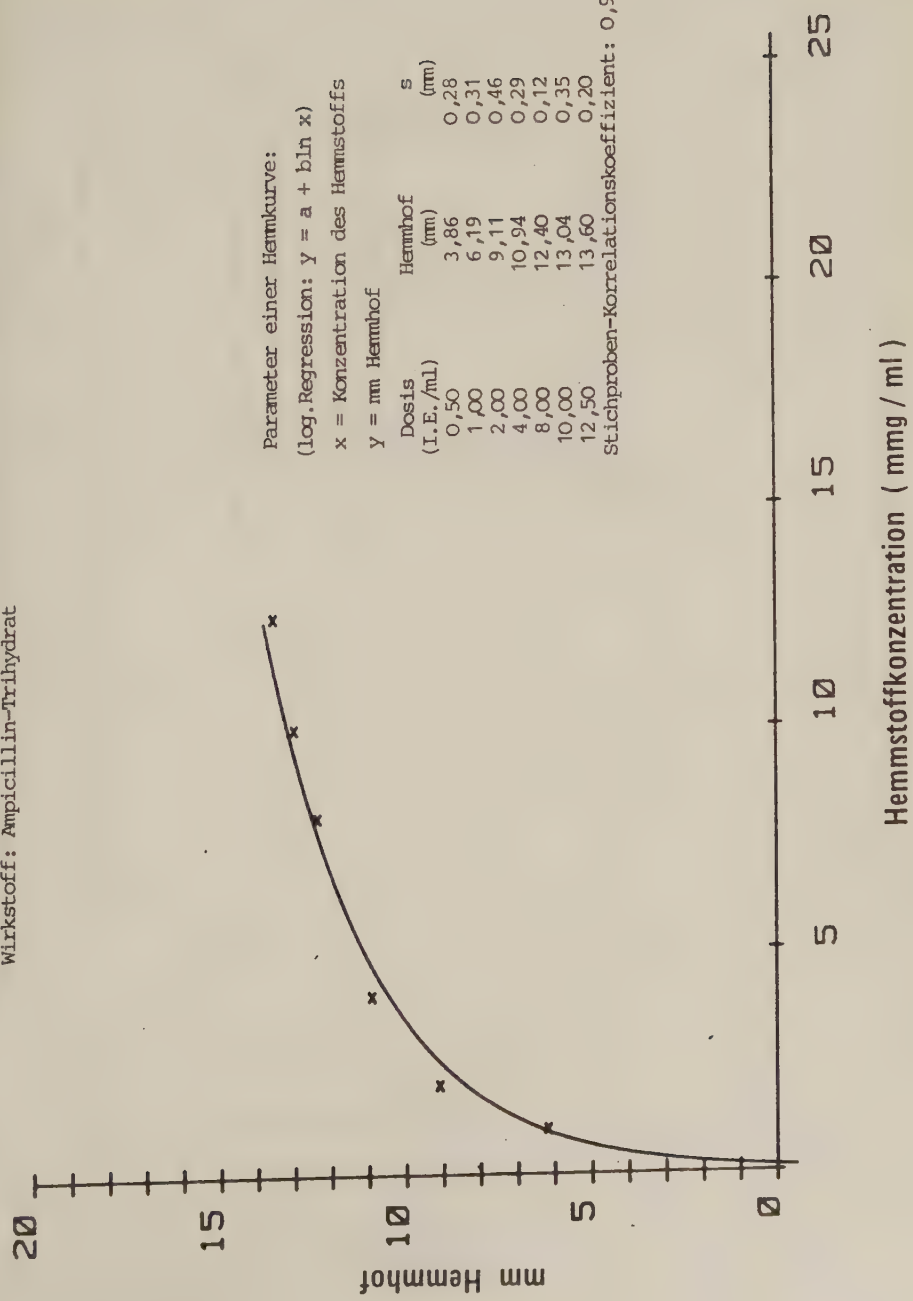
SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

%WF = %Wiederfindung

Abbildung 8a : Verlauf der Standardkurve bei Ansatz des Blättchentests in Aq. dest.

Wirkstoff: Ampicillin-Trihydrat



mm Hemmhoef

Hemmstoffkonzentration (mmg / ml)

Abbildung 8 b:

Verlauf der Standardkurve bei Ansatz des Blättchentests in Aq. dest.
Wirkstoff: Procain Penicillin G

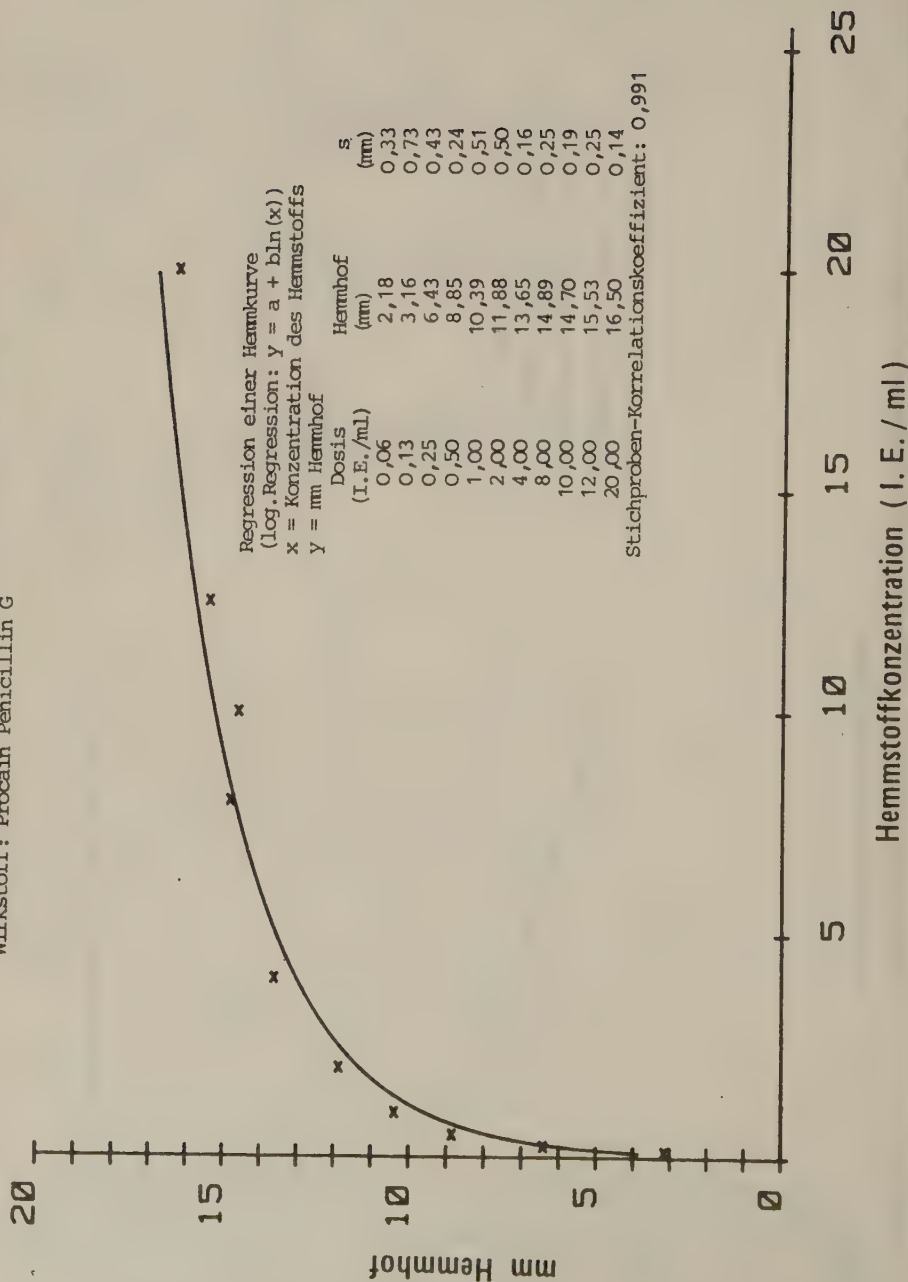


Abbildung 3c: Verlauf der Standardkurve bei Ansatz des Blättchentests in Äq. dest. Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G

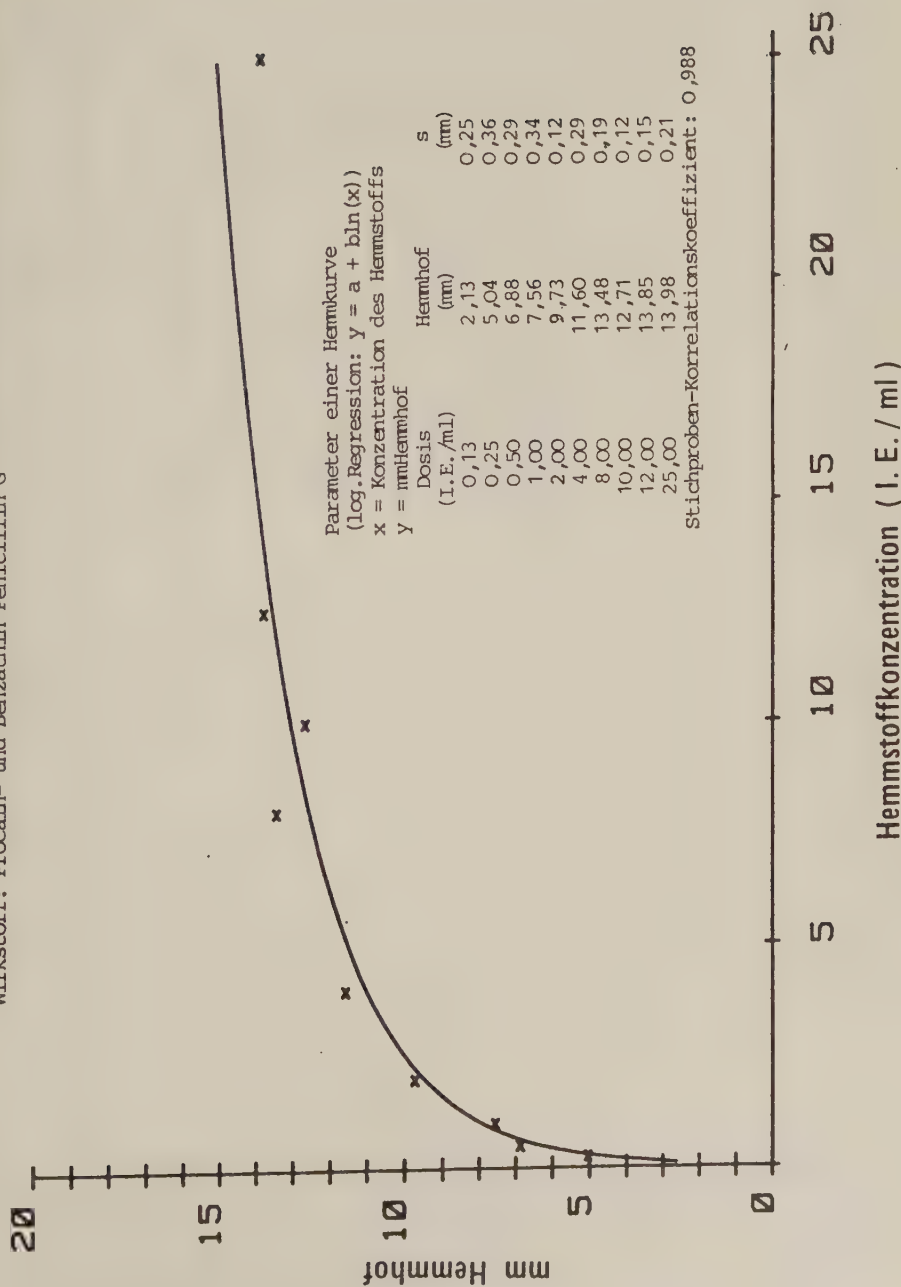


Abbildung 8 d:

Verlauf der Standardkurve bei Ansatz des Blättchentests in Aq. dest.

Wirkstoff: Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin

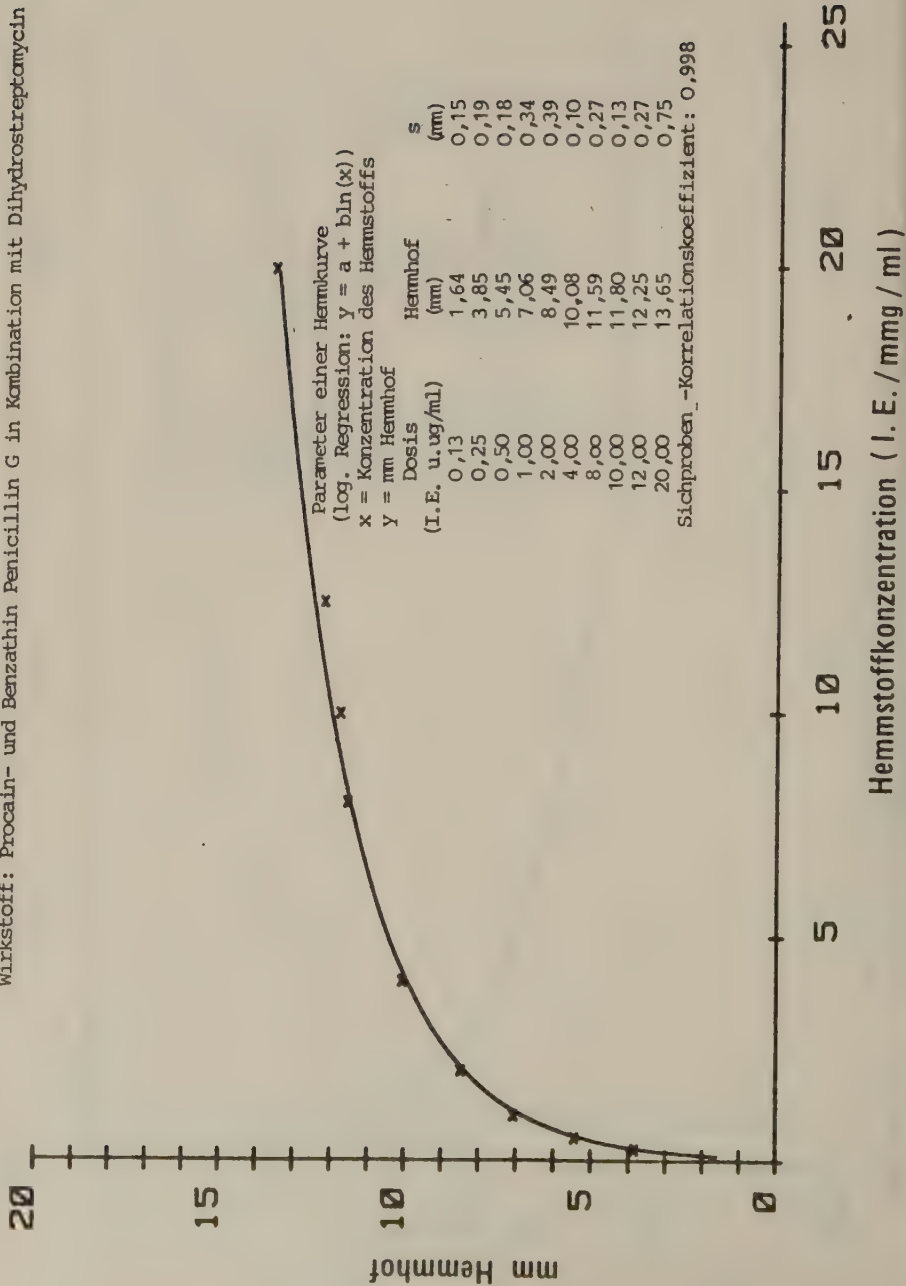


Abbildung 8 e: Verlauf der Standardkurve bei Ansatz des Agarlochtests in Blutplasma

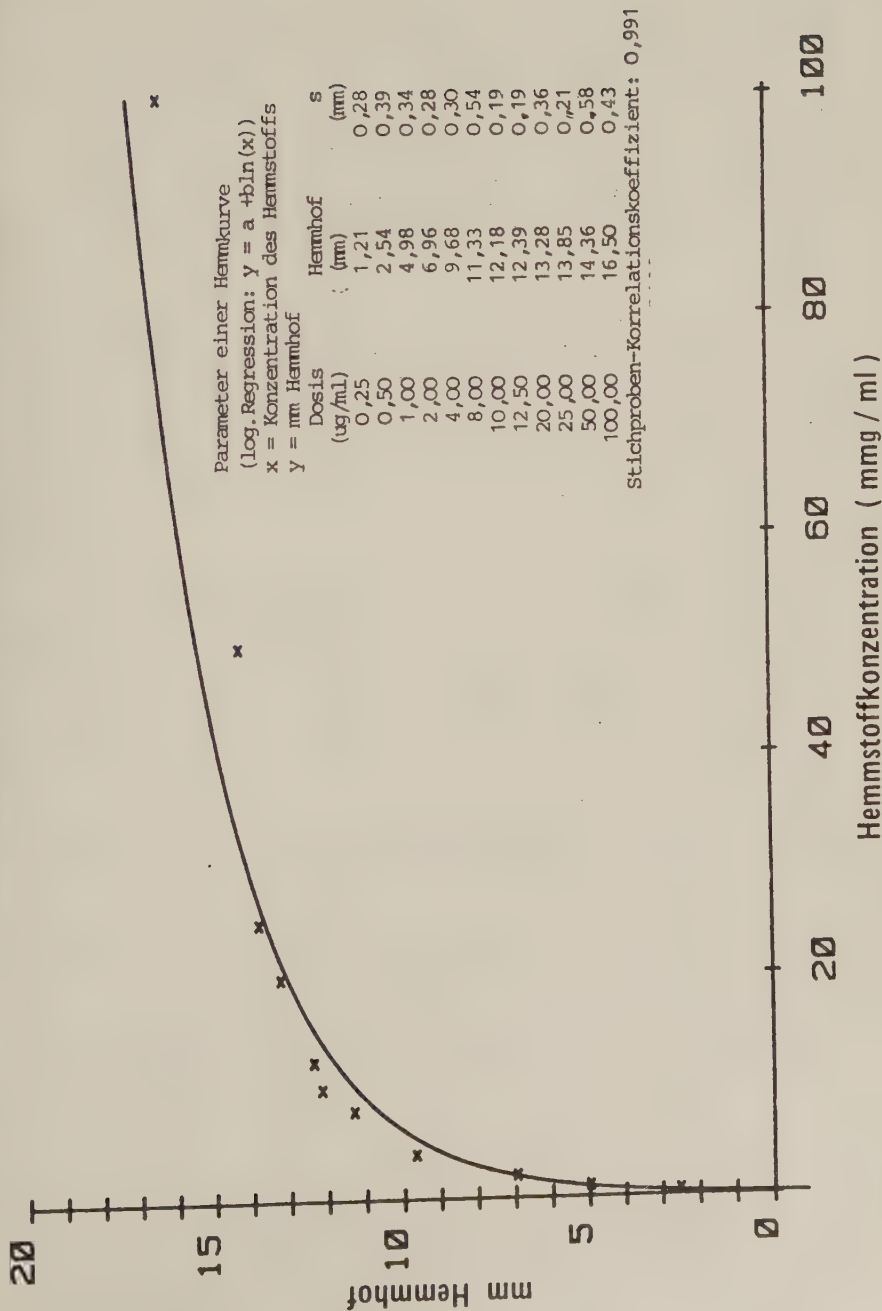


Tabelle 23: Mittlere Hemmhoftgrößen der unteren Konzentrationsstufen der unter 3.1.2. aufgeführten Arzneimittel (einschl. Ampicillin-Na) bei Verwendung des Agarochtests und des Blättchentests

Wirkstoff	Übergangsbereich pos./neg. (µg/IE/ml)	Anzahl d. Mes- sungen	davon pos. Ergebnis (mm Hemmhof) n x SD	abgeleitete Nach- weisgrenze (µg/IE/ml)
Ampicillin-Na und -Trihydrat	0,25 ¹⁾	14	7 2,09 0,81	0,50
	0,50	14	14 3,89 0,93	
Procain Peni- cillin - G	0,06 ¹⁾	10	5 2,45 0,75	0,125
	0,125	10	10 3,71 1,23	
Procain- und Benzathin Peni- cillin G	0,06 ¹⁾	18	8 1,79 0,82	0,125
	0,125	18	18 3,00 1,10	
Dihydrostrepto- mycin	2,0 ¹⁾	8	8 kein Hemmhof	4,00
	4,0	8	8 1,74 0,64	
Oxytetracyclin	0,25 ¹⁾	13	11 1,55 0,31	0,50
	0,50	13	13 3,24 0,33	

n = Anzahl der Standardkurven; $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung
1) positive und negative Ergebnisse (kein Hemmhof) bei gleicher Konzentration

Die Ergebnisse der Auswertung der positiven Kontrollen (siehe Kapitel 3.3.4.3. und 3.3.4.4.) sind in Tabelle 22 zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß bei einer Spannweite von 76 - 134 % die ermittelten Werte im Durchschnitt 102,00 % ($\pm 13,6$ %) des Sollwertes erreichen. Die errechneten Variationskoeffizienten liegen in einem Bereich von 0,004 bis 0,28 wobei sich ein Mittelwert von $0,14 \pm 0,07$ ergibt.

b) Untere Nachweisgrenze:

Bei der Untersuchung der Muskulatur- und Organproben wurde - entsprechend den Vorschriften der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschauengesetz - die Grenze der unteren Nachweisbarkeit dann als erreicht angesehen, wenn die Ausdehnung der Hemmzone bei weniger als 2 mm lag.

Als Maßstab für die untere Nachweisgrenze bei Durchführung des Blättchen- und Agarlochtests wurde zunächst untersucht, inwieweit - gemessen an der Hemmhofgröße - eine Unterscheidung von der negativen Kontrolle möglich war. Tabelle 23 gibt, unter Angabe der mittleren Hemmhofgrößen, für den Blättchentest und den Agarlochtest zunächst die Konzentrationsstufen an, bei denen der Übergang vom negativen in den positiven Bereich stattfand. Die daraus für die verwendeten Arzneimittel abgeleiteten unteren Nachweisgrenzen ergeben sich wie in Tabelle 23 angegeben.

Entsprechend wurde bei der Ableitung der Nachweisgrenzen für den Brillantschwarzreduktionstest vorgegangen (siehe Tabelle 24), wobei die dort aufgeführten unteren Grenzkonzentrationen noch eindeutig nachweisbar waren.

Tabelle 24: Konzentrationsbereiche der unter 3.1.2. aufgeführten Arzneimittel, bei denen eine antimikrobielle Wirkung im Brillantschwarzreduktionstest auftrat

Konzentration in µg/ml		0,005	0,01	0,05	Konzentration in IE/ml		0,005	0,01	0,05
Wirkstoff: Ampicillin- Trihydrat	n	6	6	6	Wirkstoff: Procain Peni- cillin G	n	6	6	6
	-	-	+	+		-	-	+	+
Konzentration IE/ml		0,003	0,01	0,05	Konzentration in µg/ml		0,01	0,05	0,1
Wirkstoff: Procain- und Benzathin Pen. G	n	6	6	6	Wirkstoff: Dihydrostrepto- mycin	n	6	6	6
	-	-	+	+		-	-	+	+
Konzentration µg/ml		0,05	0,1	0,5					
Wirkstoff: Oxytetracyclin	n	4	4	4					
	-	-	+	+					

+ = kein Farbumschlag (positive Reaktion)

- = Farbumschlag (negative Reaktion)

n = Anzahl der Standardkurven

3.5. Biometrische Auswertung

Für jedes Versuchstier sowie jeden Versuchsdurchgang wurden unter Heranziehung der berechneten Wirkstoffkonzentrationen im Plasma¹⁾ sowie eines vorgegebenen Statistikprogramms²⁾ folgende Parameter bestimmt (siehe Tabelle 25):

- a) Die Fläche unter der Wirkstoffkurve im Plasma (AUC), angegeben in Flächeneinheiten (FE), und zwar sowohl die gesamte Fläche vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt des letzten positiven Meßwerts als auch jeweils die Fläche bis 6, 12 und 24 Stunden nach der Verabreichung.
- b) Die höchste Wirkstoffkonzentration im Plasma (C max).
- c) Der Zeitpunkt der höchsten Wirkstoffkonzentration im Plasma (t max).
- d) Die Dauer bzw. Aufrechterhaltung verschiedener Grenzwerte von C max; für die Teilbereiche (Prozentgrenzen) wurden jeweils 25 %, 50 % und 75 % von C max gewählt.
- e) Der Beginn und die Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen, die hier jeweils mit 1 und 2 IE bzw. µg/ml Plasma festgesetzt wurden (Versuche 1, 2, 3, 5 und 6). Hierbei wurde der Beginn frühestens mit 20 Min festgelegt (Zeitpunkt der 1. Blutentnahme).

1) Bei der Auswertung von Versuch 4 wurden jeweils die Hemmhofgrößen als Maß für die Wirkung herangezogen.

2) Die Erstellung des Rechen- und Statistikprogramms erfolgte im Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

- f) Die Elimination des Arzneimittels (t_{EL}), gemessen an der Zeit in Minuten vom Ende der 75 %-Grenze bis zum Ende der 25 %-Grenze von C_{max} .
- g) Der Zeitpunkt (in Minuten) des letzten positiven Meßwertes.

Für die weitere Auswertung erfolgte eine Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen einmal bei Berücksichtigung aller im Versuch stehenden Tiere und einmal getrennt für die Kälber bzw. Färsen und Kühe (hier nur Mittelwerte). Mittels des Student's-t-Tests wurde zunächst überprüft, inwieweit gesicherte Unterschiede vorhanden waren. Zur weiteren Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die für die intramuskuläre Applikation in die Hinterhand erhaltenen Meßwerte gleich 100 und die für die anderen Applikationsarten erhaltenen Daten dazu in Relation gesetzt, wobei folgende Parameter berücksichtigt wurden: AUC, C_{max} , t_{max} , t_{EL} , Zeitpunkt des Erreichens und der Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen sowie des letzten positiven Meßwertes.

In Ergänzung hierzu erfolgte eine zusammenfassende Auswertung unter Heranziehung eines gemischten varianzanalytischen Modells,¹⁾ wobei Irrtumsrisiken nur approximativ interpretiert werden dürfen.

Bei dieser Auswertung wurden sog. "fixe Effekte" (fixe factors, d.h. Injektionsstelle, Präparat) und Versuchstiere als "zufällige Effekte" (random factors) berücksichtigt. Die Wirkungen dieser Einflußgrößen wurden für folgende Merkmale untersucht:

- a) Zeitpunkt Beginn und Zeitpunkt Ende des Erreichens der vorgegebenen Prozentgrenzen (25, 50 und 75 %) von C_{max} .

1) siehe Fußnote 2 auf S. 143

- b) Zeitspanne von Beginn bis Ende des Erreichens der vorgegebenen Prozentgrenzen von C_{max} .
- c) Teilkurve (Teil-AUC) zwischen den vorgegebenen Prozentgrenzen von C_{max} .
- d) Im Vergleich zur Teil-AUC verbleibende Rest-AUC.

(Siehe Tabellen 37 und 38.)

Für Versuch 4 erfolgte eine gesonderte Auswertung, wobei der Einfluß des Penicillinasezusatzes auf die genannten Parameter berücksichtigt wurde.

Für die bei der Untersuchung der Milch und des Fleisches sowie der Organe erhaltenen Meßwerte erfolgte eine Auswertung nach positiven und negativen Ergebnissen.

3.6. Auswertung des Formblattes zur "praktischen Durchführbarkeit"

Im Rahmen einer Fragebogenaktion wurden von Praktikern der Gruppenpraxis Nordschwaben Fragen zur Durchführbarkeit der Applikation von Arzneimitteln s. c. in den Trier und i. m. in die Anconaeusmuskulatur beantwortet. Die Fragebögen wurden entsprechend den in der Tabelle Nr. 26 aufgeführten Gesichtspunkten ausgewertet.

Tabelle 26: Formblatt zur praktischen Durchführbarkeit
(siehe Kapitel 3.6.)

Angaben zur Applikation von Arzneimitteln s. c. in den
Triel und i. m. in den M. triceps brachii beim Rind unter
Praxisbedingungen

Tierarzt:

Bestand:

Kuh:

Färse:

Bulle:

Kalb:

Art der Aufstallung:

(in Klammern bitte die Anzahl der behandelten Tiere angeben)

Art der Erkrankung:

verwendetes Medikament:

Dosis (Volumen):

Therapieerfolg:

Injektionsstelle

s. c. - Triel:

i. m. - M. triceps brachii:
(Anconaeusmuskulatur)

das Arzneimittel konnte

bei Tieren

gut

bei Tieren

zufriedenstellend

bei Tieren

unter Schwierigkeiten

bei Tieren

nur unter großen Schwierigkeiten

verabreicht werden.

soweit erforderlich, weitere Angaben: _____

4. Untersuchungsergebnisse

4.1. Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der untersuchten Arzneimittel

4.1.1. Allgemeine Angaben

Zur besseren Übersicht wurde bei der Darstellung der Versuchsergebnisse einheitlich wie folgt vorgegangen:

In den Tabellen "a" wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (SD) aller erfaßten Parameter für alle in dem jeweiligen Versuch stehenden Tiere zusammengefaßt. Soweit die Unterschiede zur i. m.-Applikation in die Hinterhand statistisch abgesichert werden konnten, ist dies ebenfalls in den Tabellen angezeigt. In den Tabellen "b" und "c" wurden - um eventuelle weitere Tendenzen sichtbar zu machen - die entsprechenden Werte getrennt nach Kälbern bzw. Färsen und Kühen wiedergegeben. Da in der Regel nur 2 Kühe im Versuch standen, wurden hier die Einzelwerte (EW) neben den Mittelwerten angegeben.

4.1.1.1. Versuch 1 (Ampicillin-Trihydrat)

Wie aus der Tabelle 27a hervorgeht (gleichzeitige Erfassung aller Tiere) ergibt sich für die AUC (siehe 3.5.) und damit für die Bioverfügbarkeit folgende absteigende Rangfolge für die einzelnen Applikationsarten:

s. c.-Hals - s. c.-Triel - i. m.-Anconaeus - i. m.-
Hinterhand: Ein gesicherter Unterschied zur i. m.-Applikation
in die Hinterhand konnte dabei nur für s. c.-Applikation
in den Triel nachgewiesen werden.

Für t_{max} gilt die gleiche Reihenfolge, ohne daß die Unterschiede abgesichert werden konnten. Der Zeitpunkt höchster Wirkstoffkonzentrationen im Plasma wurde nach s. c.-Applikation in den Triel und den Hals im Mittel nach 132 bzw. 143 Minuten erreicht, während dies nach i. m.-Injektion in die Hinterhand bzw. in den Anconaeus im Mittel bereits nach 70 bzw. 85 Minuten der Fall war. Dagegen zeigten sich hinsichtlich der absoluten Höhe (C_{max}) der Meßwerte praktisch keine Unterschiede. Hinsichtlich der Dauer therapeutisch wirksamer Blutspiegel ergab sich, daß die Durchschnittswerte für die s. c.-Applikation in den Triel am höchsten lagen, gefolgt von der s. c.-Injektion am Hals und den beiden i. m.-Applikationen. Auch für t_{EL} und den Zeitpunkt des letzten positiven Meßwerts zeigte sich, daß die höchsten Werte nach Verabreichung des Arzneimittels subkutan in den Triel ermittelt wurden; die Unterschiede ließen sich auch hier nicht absichern ($p > 0,05$).

In den Tabellen 27b und 27c sind die Ergebnisse getrennt nach Kälbern und Kühen dargestellt. Dabei ergibt sich, daß das Gesamtergebnis für die AUC (Tabelle 27a) mit den bei den Kälbern erhobenen Befunden übereinstimmt, während abweichend davon bei den Kühen keine Unterschiede hinsichtlich der Applikationsstellen feststellbar sind. (Da Meßwerte für die s. c.-Applikation am Hals nur von einer Kuh zur Verfügung standen, wurde der für dieses Tier relativ niedrig liegende Einzelwert nicht besonders bewertet.)

Unterschiede zwischen Kälbern und Kühen werden auch hinsichtlich t_{max} , dem Zeitpunkt des Erreichens und der Dauer therapeutisch wirksamer Blutspiegel, t_{EL} , sowie dem Zeit-

Tabelle: 27 a: Versuch Nr. 1 (Ampicillin-Trihydrat); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere (Kühe und Kälber)

Injektionsstellen									
Parameter	i. m. Hinterh.			i. m. Anconaeus			s. c. Hals		
	$\bar{x}$	SD	6	$\bar{x}$	SD	8	$\bar{x}$	SD	s. c. Trilb
Tierzahl			6			8		5	6
AUC PE	779,2	218,5		851,9	526,0		1464,1	1048,8	1357,1 ⁺⁺ 421,2
%AUC									
6 Std.	88,3	17,2		88,5	9,2		86,2	2,3	68,5 23,7
12 Std.	97,7	4,6		99,4	0,9		98,8	2,0	87,5 17,9
24 Std.	99,6	0,6		99,9	0,3		100,0	0	98,4 3,1
t max (Min.)	70,0	65,4		85,0	25,6		132,0	78,2	143,3 169,9
C max (µg / ml)	5,9	3,4		6,1	3,7		7,2	6,2	7,6 6,4
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts									
25 %	286,1	245,2		244,4	93,2		326,2	50,7	538,5 439,1
50 %	136,3	129,9		139,0	68,6		236,1	53,9	246,0 235,7
75 %	81,3	96,0		70,5	42,1		85,9	49,7	164,6 176,5
Zeitpunkt des Erreichens									
1 (µg / ml)	24,4	10,8		22,0	4,2		20,0	0	45,2 41,9
2 (µg / ml)	50,4	47,2		34,3	25,1		27,6	10,4	42,5 ¹⁾ 50,3
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)									
≥ 1 (µg / ml)	276,2	122,8		275,4	99,2		331,1	103,9	402,3 116,5
≥ 2 (µg / ml)	136,4	47,4		143,7	61,0		193,7	152,5	221,1 ¹⁾ 133,8
t EL (Min.)	174,8	135,6		137,4	62,9		163,2	117,7	323,4 317,2
letzter positiver Meßwert (Min.)	520,0	330,1		562,5	258,4		720,0	349,9	1000,0 440,5

1) Tierzahl = 5

+ = p < 0,05

++ = p < 0,01

Tabelle: 27b : Versuch Nr. 1 (Ampicillin-Trihydrat); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung der Kälber

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	4		5		4		4			
AUC FE	731,9	214,9	839,7	674,6	1714,3	1024,3	1511,0	443,7		
%AUC	6 Std.									
erreicht	98,8	0,8	94,3	5,1	86,6	2,5	83,2	6,1		
nach	100,0	0	99,9	0,3	98,6	2,2	98,1	3,2		
24 Std.	100,0	0	100,0	0	100,0	0	99,6	0,9		
t max (Min.)	30,0	11,9	88,0	30,3	150,0	77,5	60,0	28,3		
C max ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	7,7	2,5	6,9	3,9	8,5	6,4	10,5	6,0		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %									
	141,7	21,9	208,7	75,2	317,8	54,4	269,2	175,0		
	50 %									
	53,6	21,8	128,9	46,8	254,0	41,7	142,0	128,6		
	75 %									
	26,3	14,1	74,9	35,3	97,2	49,4	88,1	87,6		
Zeitpunkt des Erreichens	1 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)									
	20,0	0	20,9	2,0	20,0	0	20,0	0		
und	2 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)									
	20,0	0	21,8	3,9	24,5	9,1	20,0	0		
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	≥ 1 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)									
	210,5	57,1	231,8	77,7	365,2	79,7	403,2	77,7		
	≥ 2 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)									
	138,6	44,5	153,5	64,1	235,8	138,6	272,8	78,1		
t _{EL} (Min.)										
	106,2	51,6	119,4	51,6	128,8	105,1	152,1	108,8		
letzter positiver Meßwert (Min.)										
	330,0	124,9	516,0	316,4	780,0	373,1	750,0	227,2		

Tabelle: 27c: Versuch Nr. 1 (Ampicillin-Trihydrat); Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzelwerte und Mittelwerte)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	EW	Σ	EW	Σ	EW	Σ	EW	Σ	EW	Σ
Tierzahl		2		3		1		2		
AUC PE	682,2 1065,1	873,7	692,8 1143,0	872,2 239,4		463,2	1130,4 967,8	1049,1		
% AUC erreicht	75,7 58,7	67,2	79,5 83,3	78,9 5,0		84,7	31,9 46,3	39,1		
12 Std.	97,5 88,4	93,0	99,8 100,0	98,7 1,2		100,0	76,2 56,0	66,1		
24 Std.	98,7 99,0	98,9	100,0 100,0	99,7 0,5		100,0	99,7 92,2	96,0		
t max (Min.)	120,0 180,0	150,0	80,0 100,0	80,0 20,0		60,0	480,0 140,0	310,0		
C max (µg / ml)	2,2 2,3	2,3	2,5 3,1	4,8 3,5		2,2	1,6 2,2	1,9		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	418,4 731,3	574,9	371,1 122,1	303,9 103,1		359,9	1046,1 1107,9	1077,0		
25 %	281,1 222,2	251,7	250,8 131,8	155,8 106,8		164,5	657,8 232,0	453,9		
50 %	123,9 259,0	191,5	131,5 20,5	63,3 60,0		40,7	494,3 140,9	317,6		
75 %	46,4 20,0	33,2	20,0 31,8	23,9 6,8		20,0	120,0 70,9	95,5		
Zeitpunkt des Erreichens	104,1 118,0	111,1	87,0 20,0	55,1 33,6		39,8	132,4 ¹⁾			
und	324,5 490,7	407,6	289,9 480,2	348,3 97,8		193,9	558,4 242,9	400,7		
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	80,7 183,2	132,0	157,6 166,8	127,4 64,6		25,5	14,7 ¹⁾			
≥ 2 (µg / ml)	219,9 426,4	323,2	221,3 139,3	189,3 45,2		296,8	537,0 906,1	721,6		
t EL (Min.)	720,0 1080,0	900,0	720,0 486,0	640,0 138,6		480,0	1320,0 1600,0	1500,0		
letzter positiver Meßwert (Min.)										

1) = Werte von Kuh Nr. 13

punkt des letzten positiven Meßwerte im Plasma deutlich.

Während bei den Kälbern zwischen i. m.- und s. c.-Applikation im Hinblick auf die o. a. Parameter nicht differenziert werden kann, zeigt sich bei den Kühen eine deutliche Sonderstellung der s. c.-Injektion in den Triel.

4.1.1.2. Versuch 2 (Procain Penicillin G)

Wie aus Tabelle 28a hervorgeht, ergab sich hier die größte Fläche unter den Wirkstoffkurven im Plasma (AUC) nach s. c.-Verabreichung des Arzneimittels am Hals, wobei der Unterschied zu der i. m.-Applikation in die Hinterhand statistisch gesichert ist ($p < 0,05$). Auch das Maximum der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma lag nach s.c.-Applikation in den Hals mit 4,8 IE/ml deutlich höher als bei den anderen Applikationsformen ($p < 0,01$ bei Vergleich mit der i. m.-Injektion in die Hinterhand). Mit 560 Minuten trat der Zeitpunkt maximaler Wirkstoffkonzentrationen (t_{max}) nach s. c.-Applikation in den Triel am spätesten auf.

Wirkstoffkonzentrationen über 1 IE/ml konnten im Mittel nach i. m.-Verabreichung in die Hinterhandmuskulatur über 955 Minuten nachgewiesen werden, während dies nach s. c.-Verabreichung in den Triel nur über 472 Minuten möglich war. Bei der Betrachtung dieser Werte ist jedoch zu beachten, daß bei 2 Tieren (Färse Nr. 772 und Kuh Nr. 25) nach i. m.-Applikation in die Hinterhandmuskulatur zu keinem Zeitpunkt Wirkstoffkonzentrationen im Plasma über 1 IE/ml nachgewiesen werden konnten. Werte über 2 IE/ml im Plasma konnten nach s. c.-Verabreichung in den Triel nur bei einem Tier (Kuh Nr. 25) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 28c). Bei den übrigen Applikationsformen lag dieser Wert im Durchschnitt bei 400 bis 500 Minuten.

Die Tendenz zu verlängerten Eliminationszeiten nach subkutaner Verabreichung des Arzneimittels sowie zu über einen längeren Zeitraum meßbaren Wirkstoffkonzentrationen im Plasma zeigt sich sowohl bei gemeinsamer Auswertung aller Tiere, insbesondere aber bei getrennter Auswertung der bei den Färsen erhaltenen Ergebnisse (siehe Tabelle 28b). Bei getrennter Betrachtung der für Kühe und Färsen erhaltenen Meßwerte zeigt sich, daß in diesem Versuch speziell bei den Kühen das Arzneimittelverhalten nach s. c.-Injektion in den Triel als ungünstig zu bewerten ist, wie sich aus dem niedrigen Wert für die AUC und Cmax, dem verzögerten Auftreten von tmax und therapeutisch wirksamer Blutspiegel sowie deren Dauer ergibt.

4.1.1.3. Versuch 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G)

Die Ergebnisse aus Versuch 3 sind in den Tabellen 29 a - c zusammengefaßt.

Die im Mittel größte Fläche unter den Wirkstoffkurven im Plasma ergab sich hierbei nach i. m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur, während der niedrigste AUC-Wert nach s. c.-Verabreichung in den Triel ermittelt wurde. Beide Werte unterscheiden sich mit $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ von dem Wert für die AUC, der nach i. m.-Applikation in die Hinterhandmuskulatur ermittelt wurde.

Die Maxima der Wirkstoffkonzentrationen (Cmax) nach der Verabreichung des Arzneimittels i. m. in die Anconaeusmuskulatur und s. c. in den Hals unterscheiden sich mit 3,5 bzw. 2,8 IE/ml signifikant von dem niedriger liegenden Wert nach i.m.-Injektion in die Hinterhand; dieser Wert von 1,5 IE/ml unterscheidet sich nicht von dem nach s.c.-Applikation in den Triel ermittelten. Hierbei wurde

Tabelle: 28a: Versuch Nr. 2 (Procain Penicillin G); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x} \pm SD$) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere (Kühe und Färsen)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Tirol			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	6		6		5		5		5	
AUC FE	1532,6	670,7	1836,2	709,7	2788,6+	1300,7	1049,8	683,9		
%AUC										
erreicht	28,0	5,2	32,7	13,2	33,3	10,9	24,7	19,1		
nach	56,0	10,4	58,5	23,6	54,4	11,5	47,9	30,3		
24 Std.	85,5	7,6	88,0	9,7	80,6	10,0	72,1	18,4		
t max (Min.)	166,7	133,1	113,3	53,2	192,0	62,6	560,0 ⁺	444,3		
C max (IE / ml)	1,9	1,0	3,4	2,4	4,8++	3,1	1,4	0,6		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	1462,7	335,9	1096,3	600,0	1587,4	1169,0	1829,1	1327,4		
25%	929,9	287,2	786,3	477,2	510,6	418,8	721,5	439,5		
50%	368,5	186,2	403,4	464,2	285,7	447,8	402,5	431,8		
75%										
Zeitpunkt des Erreichens	63,6 ¹⁾	69,9	40,2	21,6	32,2	22,4	176,5 ¹⁾	114,8		
und	99,1 ²⁾	107,9	64,1 ¹⁾	66,9	128,8	99,2	123,7 ³⁾			
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmaplasma-konzentrationen (Min.)	955,4 ¹⁾	323,4	860,7	289,3	903,9	413,9	472,5 ¹⁾	489,3		
≥ 1 (IE / ml)	508,1 ²⁾	471,3	400,2 ¹⁾	379,3	426,1	481,2	1,7 ³⁾			
≥ 2 (IE / ml)										
t EL (Min.)	1032,8	374,4	656,3	355,1	1228,6	846,5	1266,3	940,5		
letzter positiver Meßwert (Min.)	2020,0	244,9	1920,0	442,5	3240,0	1536,8	3120,0	1264,3		

+ = $p < 0,05$
++ = $p < 0,01$

1) Tierzahl = 4
2) Tierzahl = 3
3) Tierzahl = 1

Tabelle:

28b: Versuch Nr. 2 (Procain penicillin G); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x} \pm SD$) bei Berücksichtigung der Färsen

Parameter	i. m. Hinterh.				i. m. Anconaeus				Injektionsstellen				s. c. Hals				s. c. Triel			
	$\bar{x}$	SD	4	4	$\bar{x}$	SD	4	4	$\bar{x}$	SD	3	3	$\bar{x}$	SD	3	3	$\bar{x}$	SD	3	3
Tierzahl																				
AUC PE			1738,5	672,6	1700,1	395,8	2648,2	1757,2	1349,3	773,7										
% AUC	6 Std.		29,6	6,0	29,4	15,7	36,3	13,1	26,5	25,8										
erreicht	12 Std.		59,2	11,6	50,6	26,0	58,0	13,1	51,4	42,1										
nach	24 Std.		88,8	7,1	85,5	10,9	80,2	11,9	71,7	25,1										
t max (Min.)			200,0	157,5	110,0	47,6	160,0	20,0	726,7	511,6										
C max (IE/ml)			2,3	1,0	2,4	1,2	4,4	2,7	1,4	0										
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %		1366,1	386,2	1379,8	526,8	1182,7	817,2	2199,3	1360,8										
	50 %		841,9	255,2	982,6	472,4	399,4	180,5	882,1	293,2										
	75 %		380,4	238,9	545,7	527,7	399,4	180,5	613,9	447,5										
Zeitpunkt des Erreichens	1 (IE/ml)		78,1 ¹⁾	77,8	41,4	26,9	23,1	5,4	189,0	137,3										
und	2 (IE/ml)		99,1 ¹⁾	107,9	21,2 ²⁾		75,5	57,4	-											
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	≥ 1 (IE/ml)		984,9 ¹⁾	385,5	883,9	295,0	709,2	447,6	629,4	459,8										
	≥ 2 (IE/ml)		508,1 ¹⁾	471,3	667,2 ²⁾		364,2	451,3	-											
1 EL (Min.)			590,0	417,7	784,8	377,5	1009,7	841,1	1463,6	937,1										
letzter positiver Meßwert (Min.)			1950,0	266,1	2040,0	427,1	3080,0	1598,0	3880,0	969,9										

- = Wert nicht erreicht

- 1) Tierzahl = 3
2) Tierzahl = 2

Tabelle: 28c: Versuch Nr. 2 (Procaïn Penicillin G); Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzel- und Mittelwerte)

Parameter	Injektionsstellen							
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Trieb	
	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$
Tierzähl		2		2		2		2
AUC FE	683,3 1558,4	1120,9	3064,1 1153,0	2108,6	2528,1 3470,2	2999,2	615,7 585,1	600,4
% AUC	24,3 25,7	25,0	40,9 37,4	39,2	23,3 34,4	28,8	29,2 14,7	22,0
erreicht	47,7 51,2	49,5	76,3 72,3	74,3	42,5 55,2	48,9	47,0 38,4	42,7
nach	77,3 80,4	78,9	97,3 88,7	93,0	73,5 88,6	81,1	79,7 65,6	72,7
t max (Min.)	120,0 80,0	100,0	180,0 60,0	120,0	300,0 180,0	240,0	140,0 480,0	310,0
C max (IE / ml)	0,7 1,8	1,3	7,8 3,3	5,6	2,1 8,7	5,4	2,1 0,5	1,3
Zeiddauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	1607,5 1704,1 1355,1 856,8 360,0 329,5	1655,8	491,5 566,8 334,9 452,6 128,8 109,2	529,2	3399,1 989,9 1198,8 156,1 1084,3 133,1	2194,5	197,4 2350,0 29,3 931,8 14,7 155,7	1273,7 480,6 85,2
Zeitpunkt des Erreichens	20,0 ¹⁾		46,1	37,8	29,5 41,6	45,8	20,0 123,7 ²⁾	
und	—		162,1 52,2	107,2	284,6 132,7	208,7	139,1 ²⁾	
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	822,7 ¹⁾		1088,8 539,6	814,2	1202,4 1189,8	1196,1	30,2 ²⁾	
t EL (Min.)	161,2 1331,7	1246,5	114,9 471,6	293,3	24,0 1013,9	519,0	1,7 ²⁾	
letzter positiver Meßwert (Min.)	2280,0 2040,0	2160,0	350,6 447,6	399,1	2295,8 818,0	1556,9	107,3 1833,6	970,5
			2040,0 1320,0	1680,0	2040,0 4920,0	3480,0	1670,0 2280,0	1980,0

— = Meßwert nicht erreicht

1) Werte von Kuh Nr. 7

2) Werte von Kuh Nr. 25

Tabelle: 29a: Versuch Nr. 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G): Zusammenfassung der erhaltenen Maßwerte ($\bar{x} + SD$) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere (Kühe und Kälber)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	5		5		6		7			
AUC FE	1117,7	426,8	1854,7 ⁺⁺	287,4	1569,3	415,3	661,6 ⁺	298,6		
% AUC erreicht	26,9	5,4	23,8	7,8	27,1	9,2	33,8	19,7		
12 Std.	36,1	9,1	35,2	11,4	41,3	11,8	54,2	19,8		
24 Std.	51,8	10,3	53,1	12,7	53,6	14,5	72,5	20,3		
t max (Min.)	76,0	35,8	52,0	17,9	117,0	79,4	282,9 ⁺	249,4		
C max (IE/ml)	1,5	0,3	3,5 ⁺	1,7	2,8 ⁺	1,3	1,2	0,5		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts	551,7	363,7	1010,6	812,3	401,5	196,5	1790,7	3374,6		
50 % oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	195,7	73,2	225,8	385,0	198,4	148,2	428,3	363,2		
75 %	229,6	216,4	91,1	36,9	95,2	92,9	239,4	250,5		
Zeitpunkt des Erreichens	34,2	22,7	20,0	0	34,6	28,6	128,9 ¹⁾	152,2		
2 (IE/ml)	—		23,6 ¹⁾	7,3	21,5 ¹⁾	2,0	76,1 ²⁾			
und										
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	≥ 1 (IE/ml)	86,0	198,0	132,8	203,7	109,6	109,3 ¹⁾	96,0		
≥ 2 (IE/ml)	—		72,8 ¹⁾	27,1	91,2 ¹⁾	63,2	17,2 ²⁾			
t EL (Min.)	408,1	320,3	743,9	886,4	277,3	166,6	1440,8	3279,3		
letzter positiver Maßwert (Min.)	6384,0	3226,0	5424,0	802,3	8070,0	2490,3	5589,0	3377,0		

- = Meßwert nicht erreicht

1) Tierzahl = 4

2) Tierzahl = 1

+ = $p < 0,05$

++ = $p < 0,01$

Tabelle: 29b: Versuch Nr. 3 (Procain- und Benzathin penicillin G); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung der Kälber

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl		3		3		4			5	
AUC _{FE}		900,5	319,3	2016,7	240,4	1533,1	519,1	644,9	345,9	
%AUC	6 Std.	28,2	6,3	23,0	6,9	26,3	10,9	40,1	19,9	
erreicht	12 Std.	38,9	9,0	33,4	9,2	40,2	14,4	55,4	18,8	
nach	24 Std.	53,8	12,0	50,7	13,4	52,1	16,8	72,8	19,2	
t max (Min.)		53,3	23,0	60,0	20,0	70,0	24,6	228,0	279,9	
C max (IE / ml)		1,4	0,4	3,3	0,2	2,8	1,3	1,3	0,5	
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %	498,0	402,4	1018,5	707,0	344,7	192,1	470,9	335,9	
	50 %	167,0	61,5	352,6	485,8	256,5	211,0	309,9	281,2	
	75 %	83,1	49,0	87,4	32,8	137,8	34,4	189,9	289,1	
Zeitpunkt des Erreichens	1 (IE / ml)	37,3	30,0	20,0	0	37,9	35,7	53,3 ¹⁾	22,2	
und	2 (IE / ml)	—	—	24,8	8,4	24,6 ¹⁾	7,3	76,1 ²⁾	—	
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	≥ 1 (IE / ml)	74,4	63,9	163,0	73,5	145,7	70,3	62,9 ¹⁾	30,6	
	≥ 2 (IE / ml)	—	—	72,2	33,2	73,8 ¹⁾	63,9	17,2 ²⁾	—	
t EL (Min.)		385,2	383,7	138,7	80,8	260,5	207,3	211,7	95,5	
letzter positiver Meßwert (Min.)		5560,0	1748,6	5280,0	831,4	8010,0	2506,4	5616,0	3192,2	

— = Meßwert nicht erreicht

1) Tierzahl = 3

2) Tierzahl = 1

Tabelle: 29c: Versuch Nr. 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G); Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzel- und Mittelwerte)

Parameter	Injektionsstellen							
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel	
	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$
Tierzahl	2		2		2		2	
AUC FE	1735,7 1151,4	1443,6	1517,1 1706,2	1611,7	1779,9 1503,7	1641,8	542,9 863,6	703,3
% AUC	21,3 28,7	25,0	16,4 33,5	25,0	34,4 23,4	28,9	23,1 13,0	18,1
erreicht	24,4 39,2	31,8	25,2 50,7	38,0	49,2 37,6	43,4	72,6 29,9	51,3
nach	41,4 56,4	48,9	45,8 67,9	56,9	66,0 47,6	56,8	94,4 49,5	72,0
t max (Min.)	120,0 100,0	110,0	40,0 40,0	40,0	40,0 240,0	140,0	360,0 480,0	420,0
C max (IE / ml)	1,5 1,7	1,6	1,6 6,2	3,9	4,1 1,3	2,7	1,1 0,5	0,8
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	935,0 329,4 300,6 177,0 212,9 112,8	632,2	1904,7 93,6 136,6 56,6 48,2 23,0	999,2	367,4 662,8 143,4 495,9 94,6 271,7	515,1	726,7 944,1 385,3 1063,2 309,7 407,9	5083,9
Zeitpunkt des Erreichens	39,1 20,0	29,6	20,0 20,0	20,0	20,0 35,9	28,0	355,6 ²⁾	
und	2 (IE / ml)		20,0 ¹⁾		23,8 ²⁾		—	
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	242,9 131,1	187,0	91,4 409,5	250,5	370,0 268,9	319,5	248,4 ²⁾	
t EL (Min.)	680,4 204,3	442,4	1843,1 50,2	946,7	254,4 367,8	311,1	152,3 8875,3	4513,8
letzter positiver Meßwert (Min.)	11520,0 3720,0	7620,0	4920,0 6360,0	5640,0	5760,0 10680,0	8220,0	1800,0 9240,0	5520,0

1) Werte von Kuh Nr. 28

2) Werte von Kuh Nr. 24

- = Meßwert nicht erreicht

mit 283 Minuten auch die längste Zeitspanne bis zum Auftreten von t_{max} gemessen ($p < 0,05$ bei Vergleich zu i. m.-Applikation in die Hinterhandmuskulatur) (siehe Tabelle 29a).

Wirkstoffkonzentrationen im Plasma von ≥ 1 IE/ml konnten nach i. m.-Injektion in die Anconaeusmuskulatur und nach s. c.-Verabreichung des Arzneimittels am Hals mit 198 bzw. 203 Minuten Dauer etwa gleichlang aufrechterhalten werden, wie dies auch nach der Injektion i. m. in die Hinterhand und s. c. am Triel (119 und 109 Minuten Dauer) der Fall war. Nach den beiden letztgenannten Applikationsformen konnten in keinem Fall (i. m. Hinterhand) bzw. in einem Fall (s. c. Triel) Wirkstoffkonzentrationen im Plasma über 2 IE/ml nachgewiesen werden.

Der hohe Mittelwert für t_{EL} nach der Applikation s. c. in den Triel ist auf den Wert von Kuh Nr. 28 (Eliminationszeit hier : 8875 Minuten) zurückzuführen (siehe Tabelle 29c).

Klare Tendenzen hinsichtlich des Zeitpunkts des letzten positiven Meßwerts lassen sich in diesem Versuch nicht erkennen (siehe Tabellen 29 a-c).

Die getrennte Aufschlüsselung der Daten für die Kälber (Tabelle 29b) und Kühe (Tabelle 29c) ergab im vorliegenden Versuch keine besonderen Abweichungen im Hinblick auf die Gesamtbewertung.

4.1.1.4. Versuch 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin)

In den Tabellen 30 a - c sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus Versuch 4 aufgeführt. Die Tabellen 30 d - f geben die Ergebnisse des Versuchs 4 nach Penicillinase-Zusatz

wieder. Da in diesem Versuch die antimikrobielle Aktivität indirekt in mm Hemmhof ausgedrückt wurde, also auch bei C_{max} (um die Vergleichbarkeit mit und ohne Penicillinase-Zusatz zu gewährleisten), konnte eine weitere Auswertung nach dem Erreichen bzw. der Aufrechterhaltung vorgegebener therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen nicht durchgeführt werden. Lediglich in Tabelle 3o g werden nach Zusatz von Penicillinase die Angaben zu den Konzentrationen von C_{max} in µg/ml gemacht.

Bei Vergleich der Ergebnisse in den Tabellen 3o a-c und 3o d-f zeigt sich, daß das Verhalten der antimikrobiell wirksamen Rückstände im Plasma bei gemeinsamer Bestimmung des Penicillin- und Aminoglycosidanteils weitgehend vom Ersteren abhängt; dies ergibt sich insbesondere für die Parameter t_{max}, t_{EL} und "letzter positiver Meßwert", für die bei alleiniger Erfassung des Aminoglycosidanteils in jedem Fall kürzere Zeitspannen ermittelt wurden.

Bei diesem Versuch wurde unabhängig vom Versuchstier für die AUC nach intramuskulärer Injektion in die Hinterhand stets die kleinste Fläche ermittelt. Dieser Unterschied war z. T. hochsignifikant (siehe Tabellen 3o a und d). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Zeitdauer des Verbleibens von Wirkstoffgehalten oberhalb von 25 und 50 % von C_{max} wieder, wo in der Regel für die i. m.-Injektion in die Hinterhand die kürzesten Zeiträume ermittelt wurden. Die gleiche Aussage gilt für die Meßparameter t_{EL} und "letzter positiver Meßwert".

Geringe bzw. keine Unterschiede ergaben sich dagegen für die Zeitpunkte der jeweiligen Höchstkonzentrationen im Plasma (t_{max}; Tabellen 3o a - c). Sie liegen alle bei 150 Minuten, und auch der Wert von 106 Minuten, wie er nach Applikation in die Anconaeusmuskulatur nachgewiesen werden konnte, ist bei einer Standardabweichung von 60,2 Minuten nicht unterschiedlich.

Tabelle: 30a: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin komb. mit Dihydrostreptomycin);
 Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere
 - Versuchsansatz ohne Penicillinase - (Kühe und Färsen)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Truel			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	5		6		6		5			
AUC FE	25143,6		5950,7		52704,6 + 25206,3		53216,7 + 29255,4		40640,4 19220,6	
% AUC										
6 Std.	32,3		4,5		27,6		10,6		24,9 5,2	
12 Std.	58,8		7,0		49,4		17,2		47,5 8,8	
24 Std.	93,2		10,1		73,9		17,4		78,3 13,6	
t max (Min.)	148,0		94,5		106,7		60,2		150,0 116,5	
C max (mm) 1)	8,0		0,6		9,4 ⁺⁺		0,8		10,0 ⁺ 2,1	
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts	25 %		1783,6		414,8		3005,5		716,9	
oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max	50 %		1089,0		139,8		1237,2		358,1	
(Min.)	75 %		453,5		204,9		447,4		74,8	
t EL (Min.)			1302,0		442,7		2543,9 ⁺⁺		705,9	
letzter positiver Meßwert (Min.)			1872,0		697,7		2960,0		738,4	
									</	

Tabelle: 30b: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Komb. mit Dihydrostreptomycin);
Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x} \pm SD$) bei Berücksichtigung der Färsen
- Versuchsansatz ohne Penicillinase -

Injektionsstellen									
Parameter	i. m. Hinterh.			i. m. Anconaeus			s. c. Hals		
	$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD	s. c. Triel
Tierzahl	3		4			4			3
AUC FE	22642,5	4977,1	49671,8	27045,2	51610,2	34591,5	43507,3	21036,0	
% AUC	6 Std.	33,6	5,3	30,1	12,5	23,7	6,2	25,9	13,0
erreicht	12 Std.	60,2	8,5	53,3	19,9	45,6	10,4	51,2	27,4
nach	24 Std.	97,0	4,0	77,4	18,7	77,0	17,0	75,1	21,6
t max (Min.)		86,7	11,6	130,0	60,0	130,0	113,7	120,0	52,9
C max (mm) ¹⁾		7,9	0,8	9,9	0,5	9,1	1,6	6,7	0,2
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts	25 %	1736,6	300,6	2959,1	717,9	2186,4	714,8	2291,6	497,4
oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max	50 %	1096,9	165,0	1310,1	435,9	1320,4	304,6	1419,7	537,7
(Min.)	75 %	403,1	272,7	445,4	79,7	583,3	219,7	852,4	416,7
t EL (Min.)		1298,1	396,1	2489,3	651,5	1554,1	598,3	1420,6	617,6
letzter positiver Meßwert (Min.)		1680,0	360,0	2940,0	749,4	2550,0	981,6	2000,0	816,8

1) siehe S. 162

Tabelle: 30c: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Komb. mit Dihydrostreptomycin);
 Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzel- und Mittelwerte)
 - Versuchsansatz ohne Penicillinase -

Injektionsstellen												
Parameter	EW	i. m. Hinterh.	$\bar{x}$	EW	i. m. Anconaeus	$\bar{x}$	EW	s. c. Hals	$\bar{x}$	EW	s. c. Triel	$\bar{x}$
Tierzahl		2		2			2				2	
AUC FE	33648,4 24141,8	28895,1		79651,7 37888,5	58770,1		74577,6 38281,5	56429,6		20045,1 52635,3	36340,2	
% AUC	6 Std. 37,8	30,4		19,3 26,0	22,7		26,0 28,6	27,3		32,8 18,1	25,5	
erreicht	12 Std. 52,4 61,0	56,7		34,0 49,0	41,5		48,7 54,0	51,4		56,4 36,3	46,4	
nach	24 Std. 76,0 99,1	87,6		54,3 79,7	67,0		76,2 85,6	80,9		86,6 100,0	93,3	
t max (Min.)	300,0 180,0	240,0		40,0 80,0	60,0		300,0 80,0	190,0		240,0 160,0	200,0	
C max (mm.) 1)	8,3 8,1	8,2		9,0 8,1	8,6		13,5 10,0	11,8		8,1 5,0	6,6	
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts	25 % 2349,5 1358,8	1854,2		3804,5 2392,0	3098,3		2077,0 1843,4	1960,2		1315,2 4028,5	2671,9	
50 % oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max	969,3 1185,0	1077,2		1031,7 1151,0	1091,4		839,4 1034,7	937,1		767,0 3735,9	2251,5	
(Min.) 75 %	534,9 523,2	529,1		384,9 517,9	451,4		493,4 584,5	539,0		279,4 708,7	494,1	
t EL (Min.)	1792,8 823,1	1308,0		3407,5 1862,8	2635,2		1565,1 1247,1	1406,1		1006,2 3267,5	2136,9	
letzter positiver Meßwert (Min.)	3000,0 1320,0	2160,0		3720,0 2380,0	3000,0		5760,0 2280,0	4020,0		1680,0 3720,0	2700,0	

1) siehe s. 162

Tabelle: 30 d: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Komb. mit Dihydrostreptomycin); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere - Versuchsansatz mit Penicillinase - (Kühe und Färsen)

Parameter	Injektionsstellen							
	i. m. Hinterh.	i. m. Anconaeus	s. c. Hals	s. c. Triel				
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	5	6	6	6	5	5		
AUC	3237,1	1645,1	7152,1 ⁺	4308,9	5909,6 ⁺⁺	1406,6	6879,2 ⁺	2898,3
% AUC FE	6 Std.	78,4	59,2	18,3	60,7	10,3	51,2	9,6
erreicht	12 Std.	98,9	80,3	20,6	94,1	5,2	89,4	8,5
nach	24 Std.	100,0	89,0	15,7	100,0	0,1	98,7	2,9
t max (Min.)	92,0	52,2	76,7	55,7	63,3	26,6	124,0	59,0
C max (mm.)	6,8	0,9	7,7	0,9	7,8	1,2	6,1	1,9
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %	637,3	414,3	1084,6	845,1	419,3	854,7	338,3
	50 %	376,3	145,0	466,8	242,1	190,2	538,2	187,9
	75 %	198,7	84,8	321,8	259,2	126,0	239,7	226,4
t EL (Min.)	419,1	330,2	751,4	642,2	607,3	333,6	594,3	420,3
letzter positiver Meßwert (Min.)	624,0	419,1	1320,0	806,8	800,0	290,7	1176,0	642,9

1) siehe S. 162

+ = $p < 0,05$

++ = $p < 0,01$

Tabelle: 30 e: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Komb. mit Dihydrostreptomycin;
Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung der Färsen
- Versuchsansatz mit Penicillinase -

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaaus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl		3		4		4			3	
AUC FE	3104,9	1930,1	5154,6	2843,9	6217,7	1191,1	6333,5	3440,9		
% AUC										
6 Std.	77,7	21,0	66,0	18,5	57,2	5,5	55,0	11,3		
12 Std.	99,0	1,8	89,7	18,6	93,5	5,4	91,7	7,9		
24 Std.	100,0	0	95,3	9,5	100,0	0,1	100,0	0		
t max (Min.)	100,0	69,3	95,0	59,7	65,0	30,0	146,7	11,6		
C max (mm) 1)	6,3	0,6	8,0	0,9	7,7	1,1	5,7	0,3		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts	25 %	727,3	549,3	116,8	975,9	482,4	941,0	446,4		
oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	50 %	410,1	182,6	99,1	501,6	210,4	576,5	110,3		
	75 %	209,0	109,4	12,1	237,4	127,5	187,8	28,3		
t EL (Min.)	501,2	436,3	344,4	108,6	705,9	381,2	733,8	452,8		
letzter positiver Meßwert (Min.)	680,0	554,3	900,0	608,0	870,0	315,6	1040,0	567,1		

1) siehe S. 162

Tabelle: 30 f: Versuch Nr. 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Komb. mit Dihydrostreptomycin;
Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzel- und Mittelwerte)
- Versuchsansatz mit Penicillinase -

Parameter	Injektionsstellen							
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel	
	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$
Tierzahl	2		2		2		2	
AUC PE	4708,7 2162,0	3435,4	14363,3 7931,2	11147,3	3793,7 6792,7	5293,2	9658,3 5137,3	7697,8
% AUC	6 Std. 91,5	79,5	39,0 52,1	45,6	79,7 55,3	67,5	45,6 45,2	45,4
erreicht	12 Std. 97,5	98,8	59,5 63,1	61,3	100,0 90,7	95,4	77,9 93,8	85,9
nach	24 Std. 100,0	100,0	60,7 92,2	76,5	100,0 100,0	100,0	93,6 100,0	96,8
t max (Min.)	100,0 60,0	80,0	60,0 20,6	40,0	80,0 40,0	60,0	20,0 160,0	90,0
C max (mm) 1)	7,5 7,9	7,7	6,5 7,6	7,1	6,7 9,4	8,1	4,2 9,2	6,7
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 % 396,6 392,5 259,0	502,4	2269,9 2061,9 876,4 608,0	2165,9	501,8 843,3 269,2 531,0	672,6	684,5 765,8 250,6 710,8	725,2
	75 % 228,0 138,2	183,1	834,6 345,5	590,1	124,9 371,9	248,4	15,0 620,3	317,7
t EL (Min.)	346,4 245,7	296,1	1424,2 1706,4	1565,3	365,9 454,1	410,0	659,5 110,6	385,1
letzter positiver Meßwert (Min.)	720,0 360,0	540,0	2280,0 2240,0	2260,0	480,0 840,0	660,0	2040,0 720,0	1380,0

1) siehe S. 162

Tabelle 30 g: Höchste Wirkstoffkonzentrationen (Cmax) im Plasma
bei selektiver Erfassung des Dihydrostrepto-
mycin durch Zusatz von Penicillinase (Versuch 4)

- Angaben in µg/ml -

Tier Nr.	Wirkstoffkonzentration (Cmax) nach Verabreichung in			
	Hinterhand (i.m.)	Anconaeus (i.m.)	Hals (s.c.)	Triel (s.c.)
3	35,1	41,9	30,6	23,3
9	39,9		28,8	
26		9,3		8,2
216	22,0	33,9	35,6	6,4
219	8,6	48,2	27,9	15,6
220	30,0	39,1	23,6	21,3
772		73,9	14,0	
n	5	6	6	5
$\bar{x}$	27,1	41,1	26,8	15,0
SD	12,3	20,9	7,4	7,6

Tabelle: 31 a: Versuch Nr. 5 (Oxytetracyclin): Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x} \pm SD$) bei Berücksichtigung aller Versuchstiere (Kühe und Färsen)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.	i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel				
Tierzahl	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
AUC FE	3259,1	716,1	3621,7	1218,6	3611,7	1152,1	2931,1	1271,2		
% AUC	21,4	7,3	16,6	11,4	16,2	5,3	7,8	3,5		
erreicht	44,0	9,8	39,3	19,3	39,3	6,8	23,8	6,2		
nach	77,2	9,9	72,4	16,3	75,5	7,0	59,0	7,6		
t max (Min.)	200,0	209,8	562,9 ⁺	335,9	495,0	231,7	1148,6 ⁺⁺	494,1		
C max ($\mu\text{g/ml}$)	3,6	1,6	2,9	1,2	2,9	0,7	1,8 ⁺	0,6		
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	1696,2	608,2	1924,9	512,9	1801,4	221,0	2243,2	278,6		
	882,6	628,2	1218,0	498,2	1236,6	220,6	1648,7	198,4		
	393,5	402,6	706,4	347,9	531,9	215,4	902,8	585,4		
Zeitpunkt des Erreichens	40,6	41,2	116,7	135,3	53,1	28,3	591,0	641,6		
und	178,3	201,7	271,6 ¹⁾	322,6	249,6	134,6	831,8 ⁺⁺²⁾	298,7		
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.) ≥ 1 ($\mu\text{g/ml}$)	1224,9	171,0	1501,9	405,5	1572,8	455,3	1278,7	891,7		
konzentrationen (Min.) ≥ 2 ($\mu\text{g/ml}$)	428,0	496,7	805,4 ¹⁾	383,7	609,8	624,1	483,5 ²⁾	596,7		
t EL (Min.)	1203,9	144,9	958,0	335,9	1005,7	240,3	935,7	389,9		
letzter positiver Meßwert (Min.)	2730,0	681,5	3000,0	1062,1	2810,0	623,5	3360,0	360,0		

+ = p > 0,05

++ = p > 0,01

1) Tierzahl = 5

2) Tierzahl = 3

Tabelle: 31 b: Versuch Nr. 5 (Oxytetracyclin); Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte ($\bar{x}$ + SD) bei Berücksichtigung der Färsen

Parameter	Injektionsstellen							
	i. m. Hinterh.	i. m. Anconaeus	s. c. Hals	s. c. Triel				
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tierzahl	3	4	3	4				
AUC FE	2981,8	554,9	3184,0	963,8	3324,0	1222,5	2832,5	1203,1
% AUC	19,3	7,5	15,8	13,8	16,1	6,5	10,0	3,1
erreicht	41,4	10,1	39,2	24,2	38,7	8,1	27,0	6,5
nach	74,9	10,6	71,5	19,7	75,2	8,5	62,7	7,4
t max (Min.)	246,7	230,1	700,0	377,4	460,0	270,6	900,0	398,0
C max ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	3,2	1,7	2,7	0,6	2,6	0,4	1,8	0,5
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	1804,4	696,2	1903,2	643,4	1833,6	258,9	2233,5	297,9
	921,8	763,4	1127,1	410,3	1201,8	256,5	1637,2	154,1
	498,4	420,9	542,4	191,9	600,8	202,9	1106,4	453,1
Zeitpunkt des Erreichens	47,4	47,5	164,2	167,7	58,4	32,1	439,6	512,7
und	231,1	210,5	282,9 ¹⁾	390,6	295,2	121,1	578,2 ²⁾	
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.) ≥ 1 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	1306,8	218,9	1398,6	420,5	1546,7	554,0	701,8	559,7
≥ 2 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	210,4	420,5	621,9 ¹⁾	403,9	381,3	320,6	1157,7 ²⁾	
t EL (Min.)	1181,5	168,8	1023,0	394,0	1044,3	278,6	970,0	142,6
letzter positiver Meßwert (Min.)	2880,0	749,4	3030,0	1152,6	2880,0	749,4	3180,0	360,0

1) Tierzahl = 3
2) Tierzahl = 1

Tabelle: 31 c: Versuch Nr. 5 (Oxytetracyclin); Zusammenfassung der für Kühe erhaltenen Meßwerte (Einzel- und Mittelwerte)

Parameter	Injektionsstellen									
	i. m. Hinterh.		i. m. Anconaeus		s. c. Hals		s. c. Triel			
	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	$\bar{x}$	EW	SD
Tierzahl		1		3		1		3		
AUC	4090,9		4773,9 5306,8 2534,6	84205,2	1470,9	4474,8	3972,7 1150,4 4026,1	43063,1	1622,0	
% AUC	27,4		27,5 18,0 14,0	17,7	10,0	16,6	4,2 5,9 17,2	4,8	0,5	
erreicht	51,9		23,8 55,2	39,3	15,7	40,7	21,0	19,5	2,2	
nach	84,2		38,7 87,6	73,6	14,7	76,3	50,7 60,5	54,2	5,5	
t max (Min.)	60,0		60,0 240,0	380,0	192,9	60,0	180,0 1680,0	1480,0	454,3	
C max ($\mu\text{g/ml}$)	4,8		5,3 1,9	3,2	1,8	3,8	2,7 1,2	2,0	0,8	
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	1371,6		2194,0 1483,0 2184,0	1953,7	407,5	1704,6	2288,0 2516,1	2246,0	329,3	
	765,1		1982,5 1288,9	1406,0	516,4	1340,9	1436,8 1989,0	1664,0	286,2	
	78,2		1666,5 511,4	1025,0	583,7	325,3	127,4 1487,5	631,4	725,6	
Zeitpunkt des Erreichens	20,0		106,5 39,9 489,1	53,4	46,5	37,1	31,6 178,1 1467,5	61193,5	762,7	
und	20,0		20,0	254,6	-	112,6	456,0 1161,1	958,6		
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.) ≥ 1 ($\mu\text{g/ml}$)	1635,3		2409,7 1863,0 1266,3	1639,7	422,2	1650,9	1932,8 2373,6	1449,8	1238,1	
konzentrationen (Min.) ≥ 2 ($\mu\text{g/ml}$)	1080,5		117,3 1050,8	1084,1	1295,3		269,2 528,5	398,9		
t EL (Min.)	1271,1		562,3 1105,6	872,3	293,0	889,7	1511,5 618,1	878,0	647,1	
letzter positiver Meßwert (Min.)	2280,0		4336,0 5280,0	2960,0	1177,8	2640,0	3720,0 3120,0	3600,0	207,8	

Für die mittlere Höchstkonzentration im Plasma (C_{max}) ergibt sich - wohl aufgrund der auffallend niedrigen Standardabweichung - ein gesicherter Unterschied gegenüber der i. m.-Applikation in die Hinterhand sowohl nach i. m.-Verabreichung in den Anconaeus ($p < 0,01$) als auch nach s. c.-Verabreichung in den Hals ($p < 0,05$); die Werte liegen jedoch alle im gleichen Größenbereich. Es fällt jedoch auf, daß für die s. c.-Applikation in den Triel in jedem Fall der niedrigste Durchschnittswert gefunden wurde.

Bei getrennter Betrachtung der für die Kühe und Färsen erhaltenen Meßwerte lassen sich keine besonderen Unterschiede erkennen.

4.1.1.5. Versuch 5 (Oxytetracyclin)

Bei diesem Versuch ergab sich für die AUC der niedrigste bzw. höchste Durchschnittswert nach Verabreichung des Arzneimittels in den Triel bzw. i.m. in die Anconaeusmuskulatur. Gesicherte Unterschiede sind aufgrund der starken individuellen Variationen jedoch nicht zu erkennen, wie aus Tabelle 31a hervorgeht. Dagegen ist die Zeitspanne bis zum Erreichen von C_{max} nach Injektion am Triel deutlich länger als z. B. nach i. m.-Injektion in die Hinterhandmuskulatur (1148 Minuten gegenüber 200 Minuten; $p < 0,01$). Nach s. c.-Verabreichung des Arzneimittels in den Triel wurde mit 1,8 $\mu\text{g/ml}$ auch der niedrigste Durchschnittswert für C_{max} gemessen, wobei gleichzeitig die Tendenz erkennbar war, daß - gemessen an den vorgegebenen Parametern - therapeutisch wirksame Blutspiegel zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wurden. Weitere Tendenzen in bezug zur Art der Applikation - z. B. hinsichtlich der Dauer des Vorkommens antimikrobiell wirksamer Rückstände im Plasma - lassen sich aus den in Tabelle 31a dargelegten Werten nicht erkennen.

Tabelle 32: Versuch Nr. 6 (Oxytetracyclin-Langzeitpräparation)
Einzelwerte von Tier Nr. 581 aus 2 Versuchsdurchgängen

Parameter	Injektionsstellen				
	i.m. Anconaeus ¹⁾	i.m. Anconaeus ²⁾	s.c. Hals	s.c. Triel	SD
Tierzahl			$\bar{x}$	$\bar{x}$	SD
AUC	18210,1	12446,0			
% AUC	6 Std.	10,8	8,8		
erreicht	12 Std.	25,2	21,7		
nach	24 Std.	42,9	36,1		
t max (Min.)	600,0	80,0			
C max ($\mu\text{g/ml}$)	8,0	5,5			
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 % 2998,4 50 % 2432,3 75 % 2110,1	4050,0 1137,8 811,5			
Zeitpunkt des Erreichens	1 ($\mu\text{g/ml}$) 2 ($\mu\text{g/ml}$)	20,0 24,2			
Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	≥ 1 ($\mu\text{g/ml}$) 4163,6 ≥ 2 ($\mu\text{g/ml}$) 2987,8	28,4 4615,8 2748,0			
t EL (Min.)	727,3	3226,9			
letzter positiver Meßwert (Min.)	10080,0	10080,0			

1) Verteilung auf 1 Injektionsstelle 2) Verteilung auf 2 Injektionsstellen

Die Beobachtung bei der gemeinsamen Auswertung aller im Versuch stehenden Tiere, daß nach Injektion des Arzneimittels s. c. in den Tril therapeutisch wirksame Blutspiegel im Vergleich zu den anderen Applikationsarten später erreicht wurden, bestätigt sich auch bei getrennter Betrachtung von Färsen und Kühen, wobei der Effekt bei Letzteren besonders deutlich wird (siehe Tabellen 31 b und c).

4.1.1.6. Versuch 6 (Oxytetracyclin-Langzeitpräparation)

Wie aus Tabelle³² hervorgeht, wurde das Arzneimittel in einem Fall auf 2 Injektionsstellen verteilt verabreicht (rechte und linke Anconaeusmuskulatur). Beim zweiten Versuchsdurchgang wurde das gesamte Volumen (20 ml) an eine Stelle (rechter M. triceps brachii) appliziert.

Deutliche Unterschiede innerhalb der Versuchsdurchgänge ergeben sich sowohl für den Zeitpunkt der höchsten Wirkstoffkonzentration im Plasma (t_{max}) als auch für die berechnete Größe t_{EL} ¹⁾. So betrug t_{max} nach Verteilung auf 2 Injektionsstellen 80 Minuten, bei Verabreichung der gesamten Menge an nur einer Injektionsstelle hingegen 600 Minuten. Anders liegen die Verhältnisse für die Eliminationszeiten, wobei diese nach Verteilung auf zwei Applikationsstellen 3227 Minuten, im anderen Fall nur 727 Minuten betrug. Die Höchstkonzentrationen im Plasma unterscheiden sich ebenso wie die AUC nur unwesentlich.

1) siehe Seite 144

4.1.1.7. Ergebnisse der Untersuchungen bei akut erkrankten Tieren

In den Tabellen 33 a - c sind die Ergebnisse der bei erkrankten Tieren durchgeführten Untersuchungen zusammengefaßt. Im Vergleich dazu sind die für die jeweilige Applikationsstelle bei gesunden Tieren erhaltenen Meßwerte aufgeführt.

Unterschiede, die sich auf eine deutlich veränderte Pharmakokinetik bei den erkrankten und mit Ampicillin-Trihydrat (Präparat: Ampicillin-Albrecht^R) und Oxytetracyclin (Präparat: Terramycin 100^R) behandelten Tiere zurückführen lassen, sind dabei nicht erkennbar. Der Tendenz nach zeichnet sich jedoch ab, daß bei den erkrankten Tieren höchste Wirkstoffkonzentrationen im Plasma (t_{max}) früher erreicht werden. Dies zeigt sich auch in den Zeitpunkten, zu denen die jeweiligen Prozentgrenzen von C_{max} erreicht wurden.

Wie sich aus der Dauer der Aufrechterhaltung bestimmter Prozentgrenzen von C_{max} ergibt, besteht bei den erkrankten Tieren weiterhin die Tendenz zu einem rascheren Abfall der Wirkstoffspiegel im Blut im Vergleich zu den gesunden Tieren. Auch die Eliminationszeit (t_{EL}) ist im Mittel bei den erkrankten Tieren kürzer. Über die Dauer der Nachweisbarkeit antimikrobiell wirksamer Rückstände im Plasma können keine weiteren Aussagen gemacht werden, da die Messungen bei 2 der 3 untersuchten kranken Tiere zu einem Zeitpunkt abgebrochen wurden, zu dem sich noch positive Werte ergaben.

Tabelle 33 a: Gegenüberstellung der Einzelwerte des erkrankten und behandelten Tieres Nr.271 (s.3.1.4.) und der Mittelwerte der in Versuch 1 stehenden gesunden Kälber nach Applikation in den Triel {s.c.)

- Wirkstoff: Ampicillin-Trihydrat -

Parameter		Einzelwerte Kalb Nr. 271	Mittelwerte der Kälber	
			$\bar{x}$	SD
AUC		983,0	1511,0	443,2
% AUC erreicht	6 Std.	98,7	83,2	6,1
	12 Std.	100,0	98,1	3,2
	24 Std.	100,0	99,6	0,9
t max (Min.)		60,0	60,0	28,3
C max ($\mu\text{g/ml}$)		6,7	10,5	6,0
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %	205,1	269,2	175,0
	50 %	131,5	142,0	128,6
	75 %	62,3	88,1	87,6
Zeitpunkt des Erreichens	1 ($\mu\text{g/ml}$)	20,0	20,0	0
	2 ($\mu\text{g/ml}$)	20,0	20,0	0
und Dauer therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen (Min.)	1 ($\mu\text{g/ml}$)	275,8	405,2	77,7
	2 ($\mu\text{g/ml}$)	159,8	272,8	78,7
t EL (Min.)		124,4	152,1	108,8
letzter positiver Meßwert (Min.)		480,0	750,0	227,2

Tabelle 33 b: Gegenüberstellung der Einzelwerte des erkrankten und behandelten Tieres Nr.9 (s.3.1.4.) und der Mittelwerte der in Versuch 5 stehenden gesunden Kühe nach Applikation in den Anconaeus (i.m.)
- Wirkstoff: Oxytetracyclin -

Parameter		Einzelwerte Kuh Nr. 9	Mittelwerte der Kühe $\bar{x}$
AUC		4478,0	4205,2
% AUC erreicht nach	6 Std.	26,3	17,7
	12 Std.	55,1	39,3
	24 Std.	93,8	73,6
t max (Min.)		240,0	380,0
C max (µg / ml)		6,2	3,2
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %	1470,3	1953,7
	50 %	1191,7	1406,0
	75 %	547,4	1025,0
Zeitpunkt des Erreichens	1 (µg / ml)	47,5	53,4
	2 (µg / ml)	55,0	254,6
und Dauer therapeutisch wirksamer Plasma- konzentrationen (Min.)	1 (µg / ml)	1529,7	1639,7
	2 (µg / ml)	1419,3	1084,1
t EL (Min.)		796,5	872,3
letzter positiver Meßwert (Min.)		1320,0	2960,0

Tabelle 33 c: Gegenüberstellung der Einzelwerte des erkrankten und behandelten Tieres Nr. 589 (s.3.1.4.) und der Mittelwerte der in Versuch 5 stehenden gesunden Färsen nach Applikation in den Triel (s.c.)
-Wirkstoff: Oxytetracyclin -

Parameter		Einzelwerte Färs Nr. 589	Mittelwerte der Färsen	
			$\bar{x}$	SD
AUC		1133,3	2832,2	1203,1
% AUC erreicht nach	6 Std.	26,1	10,0	3,1
	12 Std.	56,9	27,0	6,5
	24 Std.	95,3	62,7	7,4
t max (Min.)		720,0	900,0	398,0
C max ($\mu\text{g/ml}$)		1,6	1,8	0,5
Zeitdauer des Wirkstoffgehalts oberhalb bestimmter Prozentwerte von C max (Min.)	25 %	1409,2	2233,5	297,9
	50 %	1172,0	1637,2	154,1
	75 %	572,2	1106,4	453,1
Zeitpunkt des Erreichens und	1 ($\mu\text{g/ml}$)	57,4	439,6	512,7
	2 ($\mu\text{g/ml}$)	—	—	—
Dauer therapeutisch wirksamer Plasma- konzentrationen (Min.)	1 ($\mu\text{g/ml}$)	1063,6	701,8	559,7
	2 ($\mu\text{g/ml}$)	—	—	—
t EL (Min.)		706,4	970,0	142,6
letzter positiver Meßwert (Min.)		1320,0	3180,0	360,0

- = Meßwert nicht erreicht

4.2. Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte

Zur weiteren Verdeutlichung der erhaltenen Ergebnisse wurden die für die intramuskuläre Applikation in die Hinterhand erhaltenen Meßwerte gleich 100 und die für die anderen Applikationsarten erhaltenen Daten dazu in Relation gesetzt. Aufgeschlüsselt nach den im Versuch stehenden Tieren sowie getrennt nach den zur Erfassung der Bioverfügbarkeit herangezogenen Parametern finden sich diese Angaben in den Tabellen 34 a bis g.

Fläche unter der Kurve (AUC):

Wie Tabelle 34a zeigt, ergeben sich für die Versuche 1 - 5 bei ausschließlicher Berücksichtigung aller im Versuch stehenden Tiere für die Applikation intramuskulär in die Anconaeusmuskulatur und subkutan am Hals stets höhere Durchschnittswerte als für die Applikation intramuskulär in die Hinterhand. In 4 Fällen konnte dieser Unterschied abgesichert werden. Dagegen ergibt sich für die subkutane Applikation am Triel, daß im Versuch Nr. 2, 3 und 5 niedrigere Durchschnittswerte erzielt wurden. Auch bei getrennter Bewertung der für Kühe bzw. Färsen und Kälber erhaltenen Meßwerte bestätigt sich diese für den Triel gemachte Aussage. Mit Ausnahme von Versuch Nr. 1 gilt dies auch für die Injektion in die Ellenbogenmuskulatur bzw. die Verabreichung subkutan am Hals.

Wirkstoffmaxima (Cmax):

Aus den in Tabelle 34b zusammengefaßten Daten geht hervor, daß - mit Ausnahme von Versuch Nr. 5 - bei Berücksichtigung aller im Versuch stehenden Tiere für die intramuskuläre Applikation in den Anconaeus bzw. die subkutane Verabreichung am Hals stets höhere Durchschnittswerte als für die intramuskuläre Applikation in die Hinterhand ermittelt wurden. In fünf Fällen konnte dieser Unterschied

abgesichert werden. Mit Ausnahme von Versuch Nr. 1 gilt diese Aussage auch für die getrennte Aufschlüsselung der Daten nach Kühen bzw. Färsen und Kälbern. Nach subkutaner Verabreichung in den Triel wurden jedoch in vier aus fünf Versuchen niedrigere Wirkstoffmaxima (Berücksichtigung aller im Versuch stehenden Tiere) als nach intramuskulärer Applikation in die Hinterhand erhalten. Diese Tendenz bestätigt auch die getrennte Aufschlüsselung der Daten nach Kühen und Kälbern.

Zeitpunkt des Erreichens höchster Wirkstoffkonzentrationen im Plasma (t_{max}):

Mit einer Ausnahme (Versuch Nr. 4, Auswertung der bei Kühen erhaltenen Meßwerte) ergibt sich hier, daß nach subkutaner Verabreichung in den Triel die Wirkstoffmaxima stets zu einem späteren Zeitpunkt als nach intramuskulärer Verabreichung in die Hinterhand gemessen werden konnten. Auch für die subkutane Verabreichung am Hals gilt, daß im Vergleich zur intramuskulären Applikation in die Hinterhand die maximalen Wirkstoffkonzentrationen bei Berücksichtigung aller im Versuch stehenden Tiere zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden konnten. Dagegen ergibt sich, daß nach intramuskulärer Applikation in den Anconaeus die maximalen Wirkstoffkonzentrationen in den Versuchen 2, 3 und 4 früher auftraten als nach Verabreichung des Arzneimittels intramuskulär in die Hinterhand.

Eliminationszeit (t_{EL})

Die in Tabelle 34d zusammengefaßten Daten lassen aufgrund der starken Variabilität keine klaren Unterschiede in bezug zum Ort und zu der Art der Applikation erkennen.

Letzter positiver Meßwert:

Wie aus den in Tabelle 34e zusammengefaßten Daten hervorgeht, werden nach subkutaner Verabreichung antimikrobiell wirksame Rückstände im Plasma in der Regel über einen längeren Zeitraum nachgewiesen als nach intramuskulärer Verabreichung. Dabei fällt auf, daß dies bei getrennter

Bewertung der Färsen und Kälber in allen Versuchen der Fall ist, während bei Bewertung der Kühe dies nur 4 mal (s. c. Hals) bzw. 3 mal (s. c. Triel) der Fall ist.

Zeitpunkt des Erreichens therapeutisch wirksamer Blutspiegel:

Bei Auswertung der relativen Meßwerte im Hinblick auf diesen Parameter werden Unterschiede in Abhängigkeit vom Ort der Applikation, vom verwendeten Arzneimittel sowie von der behandelten Tierart offensichtlich. So ergibt sich zunächst aus den in Tabelle 34 f zusammengefaßten Daten, daß nach subkutaner Applikation in den Triel therapeutisch wirksame Blutspiegel in der Regel zu einem späteren Zeitpunkt erreicht werden als nach intramuskulärer Applikation in die Hinterhand, aber auch als nach intramuskulärer Applikation in den Anconaeus. Offensichtlich wird dabei, daß dies bei Kühen zu einem noch späteren Zeitpunkt als bei Färsen bzw. Kälbern der Fall ist. Die Abhängigkeiten vom Arzneimittel ergeben sich daraus, daß z. B. im Versuch Nr. 3, aber auch Versuch Nr. 2, zum Teil bei keiner der gewählten Applikationsarten bzw. Applikationsorte Wirkstoffspiegel ≥ 2 IE/ml Plasma erreicht werden konnten.

Dauer therapeutisch wirksamer Blutspiegel:

Aus Tabelle 34 g ergibt sich, daß im Versuch Nr. 1 nach subkutaner Verabreichung (sowohl Triel als auch Hals) bei der Bewertung aller im Versuch stehenden Tiere über einen längeren Zeitraum therapeutisch wirksame Konzentrationen gemessen werden konnten als nach intramuskulärer Verabreichung des Arzneimittels. Wie bereits in Kapitel 4.1.1.1. dargelegt, ist dies hauptsächlich auf die bei den Kälbern erhaltenen Meßwerte zurückzuführen. In Versuch Nr. 2 und 3 dagegen ergeben sich für die subkutane Verabreichung am Triel die kürzesten Zeitspannen für die Aufrechterhaltung therapeutisch wirksamer Blutspiegel.

Tabelle 34 a: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Werte (Mittelwerte)
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: AUC

Versuch Nr.		Applikationsart		
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Triel
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	109,3	187,9	174,2 ⁺⁺
	B	114,7	234,3	206,4
	C	99,8	53,0	120,0
2 (Procain-Penicillin G)	A	119,8	182,0 ⁺	68,5
	B	97,8	152,3	77,6
	C	188,1	267,6	53,6
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	165,9 ⁺⁺	140,4	59,2 ⁺
	B	224,0	170,2	71,6
	C	111,6	113,7	48,7
4 (Procain- u. Benzathin-Pen. G und Dihydrostreptomycin)	A	209,6 ⁺	211,7 ⁺	161,6
	B	219,4	227,9	192,1
	C	203,4	132,5	182,2
5 (Oxytetracyclin)	A	111,1	110,8	89,9
	B	106,8	111,5	95,0
	C	102,8	109,4	74,9

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

+ = $p < 0,05$)

++ = $p < 0,01$) im Vergleich zu i.m.-Hinterhand

Tabelle 34 b: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte (Mittelwerte)
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: Cmax

Versuch Nr.	Applikationsart			
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Trier
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	103,4	122,0	128,8
	B	89,6	110,4	136,4
	C	208,7	95,7	82,6
2 (Procain-Penicillin G)	A	178,9	252,6 ⁺⁺	73,7
	B	104,3	191,3	60,9
	C	430,8	415,4	100,0
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	233,3 ⁺	186,7 ⁺	80,0
	B	235,7	200,0	92,9
	C	243,8	168,8	50,0
4 (Procain- u. Benzathin-Pen. G und Dihydrostreptomycin)	A	117,5 ⁺⁺	125,0 ⁺	88,8
	B	125,3	115,2	84,8
	C	104,9	143,9	80,5
5 (Oxytetracyclin)	A	80,6	72,2	50,0 ⁺
	B	84,4	75,0	56,3
	C	66,7	79,2	41,7

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

+ = $p < 0,05$) im Vergleich zu i.m.-Hinterhand

++ = $p < 0,01$)

Tabelle 34 c: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte (Mittelwerte)
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: tmax

Versuch Nr.	Applikationsart			
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Triel
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	121,4	188,6	204,7
	B	293,3	500,0	206,4
	C	53,3	40,0	206,7
2 (Procaïn-Penicillin G)	A	68,0	115,2	335,9 ⁺
	B	55,0	80,0	363,4
	C	120,0	240,0	310,0
3 (Procaïn- u. Benzathin Penicillin G)	A	68,4	153,9	372,4 ⁺
	B	112,6	131,3	427,8
	C	36,4	127,3	381,8
4 (Procaïn- u. Benzathin Pen. G und Dihydrostreptomycin)	A	72,1	101,4	102,7
	B	149,9	149,9	138,4
	C	25,0	79,2	83,3
5 (Oxytetracyclin)	A	281,5 ⁺	247,5	574,3 ⁺⁺
	B	283,7	186,5	364,8
	C	633,3	1000,0	2466,7

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

+ = $p < 0,05$) im Vergleich zu i.m.-Hinterhand

++ = $p < 0,01$)

Tabelle 34 d: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte (Mittelwerte)
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: t_{EL}

Versuch Nr.	Applikationsart			
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Triel
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	78,6	93,4	185,0
	B	112,4	122,2	143,2
	C	58,6	91,8	223,3
2 (Procain-Penicillin G)	A	63,5	119,0	122,6
	B	133,0	171,1	248,1
	C	32,0	124,9	77,9
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	182,3	67,9	353,1
	B	36,0	67,6	55,0
	C	214,0	70,3	1020,3
4 (Procain- u. Benzathin Pen. G und Dihydrostreptomycin)	A	195,4 ⁺⁺	115,6	131,1
	B	192,5	890,1	109,4
	C	201,5	107,5	163,4
5 (Oxytetracyclin)	A	79,6	83,5	77,7
	B	86,6	88,4	82,1
	C	68,6	70,0	69,1

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

⁺⁺ = $p < 0,01$) im Vergleich zu i.m.-Hinterhand

Tabelle 34 e: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte (Mittelwerte)
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: letzter positiver Meßwert

Versuch Nr.	Applikationsart			
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Trier
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	108,2	138,5	192,3
	B	156,4	236,4	227,3
	C	71,1	53,3	166,7
2 (Procain-Penicillin G)	A	95,0	160,4	154,5
	B	104,6	157,9	199,0
	C	77,8	161,1	91,7
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	85,0	126,6	87,5
	B	95,0	144,1	101,8
	C	74,0	107,9	72,4
4 (Procain- u. Benzathin Pen. G und Dihydrostreptomycin)	A	158,1	162,4	121,8
	B	175,0	151,8	119,0
	C	139,9	186,1	125,0
5 (Oxytetracyclin)	A	110,0	103,3	123,1
	B	105,2	100,0	110,4
	C	129,8	115,8	157,9

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

Tabelle 34 f: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: Zeitpunkt des Erreichens therapeutisch wirksamer Blutspiegel

Versuch Nr.		Applikationsart					
		i.m. Anconaeus		s.c. Hals		s.c. Triel	
		a	b	a	b	a	b
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	90,2	68,1	82,0	54,8	185,2	84,3
	B	104,5	109,0	100,0	122,5	100,0	100,0
	C	72,0	49,6	60,2	35,8	287,7	119,2
2 (Procain-Penicillin G)	A	63,2	64,7	50,6	130,0	277,5	142,1
	B	53,0	21,3	29,6	76,2	242,0	-
	C	-	-	-	-	-	-
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	58,5	-	171,2	-	91,5	-
	B	53,6	-	101,6	-	142,9	-
	C	67,6	-	94,6	-	-	-
5 (Oxytetracyclin)	A	287,4	152,3	130,8	140,0	1455,7	466,5 ⁺⁺
	B	346,4	122,4	123,2	127,7	927,4	250,2
	C	267,0	1273,0	185,5	563,0	3965,5	4793,0

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

a = 1 µg bzw. IE/ml

b = 2 µg bzw. IE/ml

- = keine Angaben, da keine Vergleichsmöglichkeit zu i.m.-Hinterhand bzw. die vorgegebenen Wirkstoffkonzentrationen wurden nicht erreicht

++ = $p < 0,01$ im Vergleich zu i.m.-Hinterhand

Tabelle 34 g: Relativierung und Zusammenfassung der erhaltenen Meßwerte
i. m.-Hinterhand = 100
Parameter: Dauer therapeutisch wirksamer Blutspiegel

Versuch Nr.		Applikationsart					
		i.m. Anconaeus a	b	s.c. Hals a	b	s.c. Trier a	b
1 (Ampicillin-Trihydrat)	A	99,7	105,4	119,9	142,0	145,7	162,1
	B	110,1	110,8	173,5	170,1	191,5	196,8
	C	85,5	96,5	47,6	19,3	98,3	-
2 (Procain Penicillin G)	A	90,1	78,8	94,6	83,9	49,5	-
	B	89,7	131,3	72,0	71,7	63,9	-
	C	-	-	-	-	-	-
3 (Procain- u. Benzathin Penicillin G)	A	167,7	-	170,5	-	91,5	-
	B	219,1	-	195,8	-	84,5	-
	C	103,1	-	-	-	-	-
5 (Oxytetracyclin)	A	122,6	188,2	128,4	142,5	104,4	113,0
	B	107,0	295,6	118,4	181,2	53,7	-
	C	100,3	100,3	100,9	119,9	88,7	36,9

A = Berücksichtigung aller Versuchstiere

B = Berücksichtigung der Färsen/Kälber

C = Berücksichtigung der Kühe

a = 1 µg bzw. IE/ml

b = 2 µg bzw. IE/ml

- = keine Angaben, da keine Vergleichsmöglichkeit zu "i. m.-Hinterhand" bzw. die vorgegebenen Wirkstoffkonzentrationen wurden nicht erreicht

Auch hier fällt auf, daß - gemessen an der vorgegebenen arbiträren Grenze von 1 bzw. 2 $\mu\text{g}/\text{IE}/\text{ml}$ die notwendigen Wirkstoffspiegel insbesondere nach subkutaner Verabreichung nicht erreicht werden konnten (Versuch 2 und 3).

Tabelle 35 gibt eine Übersicht der Verteilung gesicherter Unterschiede bei Heranziehung aller im Versuch stehenden Tiere zwischen der i. m.-Applikation in die Hinterhand und den übrigen Injektionsstellen unter Berücksichtigung der in den Tabellen 34 a - g aufgeführten Parameter.

Hierbei ergeben sich sowohl für die höchsten Wirkstoffkonzentrationen im Plasma (C_{max}) als auch für deren Meßzeitpunkte (t_{max}) Unterschiede nach Applikation in den Trierl im Vergleich zu den übrigen Applikationsarten. Nach s. c.-Verabreichung in den Trierl lagen die für C_{max} erhaltenen Werte in einem Fall signifikant niedriger, während nach i. m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur und s. c.-Verabreichung in den Hals die Werte für C_{max} insgesamt 5mal höher lagen als nach der Applikation in die Hinterhand. Für t_{max} und die Applikation in den Trierl wurden in 3 Fällen signifikant größere Zeitspannen bis zum Erreichen maximaler Wirkstoffspiegel im Plasma gemessen, während dies bei den beiden anderen Applikationsstellen nur einmal der Fall war. In einem Fall ergab sich für t_{EL} eine längere Zeitspanne nach der i. m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur; für die Applikation in den Trierl wurde in einem Fall ein späterer Zeitpunkt für das Erreichen therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen ermittelt.

Nach Verabreichung der Arzneimittel i. m. in den Anconaeus und s. c. in den Hals lag der für die AUC berechnete Wert in je 2 Fällen deutlich höher im Vergleich zu der i. m.-Applikation in die Hinterhand, während sich nach s. c.-Verabreichung in den Trierl einmal ein höherer und einmal ein niedrigerer Wert für die AUC ergab.

Um eventuelle weitere Tendenzen sichtbar zu machen, wurden in Tabelle 36 - analog zu Tabelle 35 - alle sich im Vergleich zur i. m.-Injektion in die Hinterhand ergebenden Abweichungen aufgelistet (unter Berücksichtigung aller Versuchstiere), wobei sich folgendes ergibt:

- 1) Die AUC sind nach i. m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur und s. c.-Verabreichung am Hals in allen 5 Versuchen größer als im Vergleich zur i. m.-Injektion in die Hinterhand. Nach Verabreichung in den Triel ist dies nur 2mal der Fall.
- 2) Eine ähnliche Verteilung ergibt sich für Cmax; in jeweils 4 Fällen wurden bei der Applikation i.m. in den Anconaeus und s.c. am Hals größere Werte im Vergleich zur i.m.-Applikation in die Hinterhand gemessen; bei der Applikation s.c. in den Triel war dies nur einmal der Fall.
- 3) Die Zeitpunkte für Cmax (t_{max}) treten in allen 5 Versuchen nach den s.c.-Applikationen (Hals und Triel) später auf als nach der i.m.-Verabreichung in die Hinterhandmuskulatur.
- 4) Die Eliminationszeit (t_{EL}) ist nach Anconaeus- und s.c.-Hals-Verabreichung in 2 Versuchen länger, während dies bei Verabreichung s.c. in den Triel 4mal der Fall ist.
- 5) Soweit die beiden vorgegebenen therapeutischen Wirkstoffspiegel erreicht wurden, ergab sich nach i.m.-Anconaeus-Applikation in 2 Fällen eine Verzögerung, bei den s.c.-Applikationen am Hals und Triel dagegen in 4 bzw. 5 Fällen.
- 6) Für die Dauer der Aufrechterhaltung therapeutisch wirksamer Plasmakonzentrationen konnten auch (der Tendenz nach keine Unterschiede festgestellt werden.
- 7) Für den letzten positiven Meßwert ergab sich, daß dieser nach s.c.-Applikation in allen Fällen (Hals) bzw. in 4 Fällen (Triel) später auftrat, während dies nach i.m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur nur in 3 Versuchen der Fall war.

Tabelle 35: Verteilung der gesicherten Unterschiede zur Injektion i.m. in die Hinterhand bei gesunden Tieren (Versuche 1 bis 5)

Parameter	Art des Unterschieds zu i.m.-Hinterhand	Injektionsstelle		
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Triel
AUC	kleiner ³⁾	-	-	1
	größer ²⁾	2	2	1
Cmax	kleiner ³⁾	-	-	1
	größer ²⁾	2	3	-
tmax	früher ²⁾	-	-	-
	später ³⁾	1	-	3
t _{EL}	kleiner	-	-	-
	größer	1	-	-
Zeitpunkt d. Erreichens therapeutischer Wirkstoffkonz.	früher ²⁾	-	-	-
	später ³⁾	-	-	1
Bioverfügbarkeit ¹⁾	besser ²⁾	4	5	1
	schlechter ³⁾	1	0	6

1) bewertet an den Kriterien AUC, Cmax, tmax und Zeitpunkt des Erreichens therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen

2) besser im Vergleich zur Injektion i.m.-Hinterhand

3) schlechter im Vergleich zur Injektion i.m.-Hinterhand

- = kein gesicherter Unterschied

Tabelle 36: Verteilung der Abweichungen zur Injektion i. m. in die Hinterhand (Versuche Nr. 1 - 5; Auswertung aller im Versuch stehenden gesunden Tiere)

Parameter	Art d. Unterschieds zu i.m.-Hinterhand	Injektionsstellen		
		i.m. Anconaeus	s.c. Hals	s.c. Trierl
AUC	kleiner ³⁾	0	0	3
	größer ²⁾	5	5	2
Cmax	kleiner ³⁾	1	1	4
	größer ²⁾	4	4	1
tmax	früher ²⁾	3	0	0
	später ³⁾	2	5	5
t _{EL}	kleiner	3	3	1
	größer	2	2	4
letzter positiver Meßwert	früher	2	0	1
	später	3	5	4
Erreichen von 1 µg/IE/ml 4)	früher ²⁾	3	2	1
	später ³⁾	1	2	3
Erreichen von 2 µg/IE/ml 4)	früher ²⁾	2	1	1
	später ³⁾	1	2	2
Dauer von 1 µg/IE/ml 4)	kleiner ³⁾	2	1	2
	größer ²⁾	2	3	2
Dauer von 2 µg/IE/ml 4)	kleiner ³⁾	1	1	0
	größer ²⁾	2	2	2
Bioverfügbarkeit ¹⁾	besser ²⁾	21	17	9
	schlechter ³⁾	8	12	19

1), 2) und 3) siehe Fußnoten Tabelle 35 auf Seite 192

4) Differenz zu n = 5 ergibt sich aus der Tatsache, daß in einigen Fällen die vorgegebenen therapeutischen Wirkstoffkonzentrationen nicht erreicht wurden bzw. sich keine Vergleichsmöglichkeit zur Applikation "i.m.-Hinterhand" ergab.

Die weiteren Ergebnisse der durchgeführten Varianzanalyse (s. S. 144) ergeben sich wie folgt:

Das in den Tabellen 37 a und b dargestellte Ergebnis stellt zunächst dar, inwieweit durch die im Versuch vorgegebenen fixen Effekte (Injektionsstelle, Arzneimittel und Versuchstier) die Teilkurven - bezogen auf bestimmte Prozentwerte von C_{max} - (Teilfläche, Beginn und Ende, Differenz Beginn/Ende sowie Restfläche) beeinflußt werden.

Dabei zeigt sich, daß bei dieser Art der Auswertung eine Beeinträchtigung durch das Versuchstier nicht oder nur der Tendenz nach gegeben ist. Dagegen ergeben sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Art des verwendeten Arzneimittels und den Ort der Applikation (Injektionsstelle).

Bezüglich der Injektionsstelle wurden die Ergebnisse weiter spezifiziert. So wird aus Tabelle 38a ersichtlich, daß bei den Versuchen 1, 2, 3 und 5 bei s.c.-Applikation in den Trierl der Zeitpunkt des Beginns und des Endes der Teilkurven im Vergleich zur i.m.-Verabreichung in den Anconaeus und die Hinterhandmuskulatur in allen Fällen (bis auf eine Ausnahme) später auftraten. Beim Vergleich der s.c.-Applikationen untereinander (Hals und Trierl) ist dies nur einmal der Fall.

Weiterhin zeigt sich eine größere Restfläche (Rest-AUC) für die i.m.-Anconaeus- und die s.c.-Hals-Applikation als für die i.m.-Hinterhand- und s.c.-Trierl-Verabreichung.

Die gesonderte Auswertung von Versuch 4 (siehe Tabelle 38b) ergab beim Vergleich Trierl-Anconaeus einen späteren Beginn der Teilkurven bei Trierl-Applikation.

Größere Rest-AUC ergaben sich in jeweils zwei Fällen für die i.m.-Anconaeus-Verabreichung im Gegensatz zur s.c.-Trierl-Applikation, während nach i.m.-Hinterhand-Injektion dieser Parameter (Rest-AUC) wiederum größer war als nach i.m.-Anconaeus-Verabreichung.

Tabelle 37 a: Ergebnis Varianzanalyse: globale Abhängigkeiten in bezug auf die fixen Effekte:
Injektionsstelle, Arzneimittel und Versuchstier (Versuche 1, 2, 3 und 5)

fixe Effekte	Prozentgrenzen Cmax	Parameter Teilkurve				Teil-AUC	Rest-AUC
		Zeitpunkt Beginn	Zeitpunkt Ende	Zeitpunkt Beginn-Ende	Zeitspanne Beginn-Ende		
Injektionsstelle	25 %	+	-	-	-	-	+
	50 %	+	+	+	ten	-	+
	75 %	+	+	+	-	-	+
Arzneimittel	25 %	-	-	-	-	+	+
	50 %	+	+	+	+	+	ten
	75 %	+	+	+	-	-	-
Versuchstier	25 %	-	-	-	-	-	-
	50 %	-	-	-	-	-	-
	75 %	-	-	-	-	-	-

Abhängigkeit:

+ (gesichert) = $p < 0,05$
 ten (Tendenz) = $0,1 \geq p \geq 0,05$
 - (nicht gegeben) = $p > 0,1$

Tabelle 37 b: Ergebnis Varianzanalyse: globale Abhängigkeiten in bezug auf die fixen Effekte:
Injektionsstelle, Arzneimittel und Versuchstier (Versuch 4)

fixe Effekte	Prozentgrenzen Cmax	Parameter Teilkurve				Teil-AUC	Rest-AUC
		Zeitpunkt Beginn	Zeitpunkt Ende	Zeitpunkt Beginn	Zeitspanne Beginn-Ende		
Injektionsstelle	25 %	ten	ten	ten	ten	+	ten
	50 %	+	-	-	-	+	+
	75 %	+	-	-	-	-	+
Arzneimittel	25 %	-	+	+	+	+	+
	50 %	-	+	+	+	+	+
	75 %	-	+	+	+	+	+
Versuchstier	25 %	-	-	-	-	-	+
	50 %	-	-	-	-	-	ten
	75 %	-	-	-	-	-	-

Abhängigkeit:

+ (gesichert) = $p < 0,05$

ten (Tendenz) = $0,1 \geq p \geq 0,05$

- (nicht gegeben) = $p > 0,05$

Tabelle 38a: Ergebnis Varianzanalyse: spezifische Abhängigkeiten in bezug auf den fixen Effekt "Injektionsstellen" (Versuche 1, 2, 3 und 5)

Vergleichsgruppe	Prozentgrenzen Cmax	Parameter Teilkurve			
		Zeitpunkt Beginn	Zeitpunkt Ende	Zeitspanne Beginn-Ende	Teil-AUC
Triel (T)	25 %	T>A ²⁾	- 1)	-	-
vs.	50 %	T>A	T>A	-	-
Ancon. (A)	75 %	T>A	T>A	-	-
Triel (T)	25 %	T>Hi	-	-	-
vs.	50 %	T>Hi	T>Hi	-	-
Hinterh. (Hi)	75 %	-	T>Hi	-	-
Triel (T)	25 %	T>Ha	-	-	-
vs.	50 %	-	-	-	-
Hals (Ha)	75 %	-	-	-	-
Ancon. (A)	25 %	-	-	-	-
vs.	50 %	-	-	-	-
Hinterh. (Hi)	75 %	-	-	-	-
Ancon. (A)	25 %	-	-	-	-
vs.	50 %	-	-	-	-
Hals (Ha)	75 %	-	-	-	-
Hinterh. (Hi)	25 %	-	-	-	-
vs.	50 %	-	-	-	-
Hals (Ha)	75 %	-	-	-	-

1) - = kein Unterschied

2) T>A (Ha, Hi) = Unterschied mit p<0,05 gesichert

Tabelle 38b: Ergebnis Varianzanalyse: spezifische Abhängigkeiten in bezug auf den fixen Effekt "Injektionsstelle" (Versuch 4)

Vergleichsgruppe		Prozentgrenzen		Parameter Teilkurve			Rest-AUC
		Cmax	Zeitpunkt Beginn	Zeitpunkt Ende	Zeitspanne Beginn-Ende	Teil-AUC	
Triel (T)		25 %	T>A ²⁾	- ¹⁾	-	T<A	-
vs.		50 %	T>A	-	-	-	T<A
Ancon. (A)		75 %	T>A	-	-	-	T<A
Triel (T)		25 %	-	-	-	-	-
vs.		50 %	-	-	-	-	-
Hinterh. (Hi)		75 %	-	-	-	-	-
Triel (T)		25 %	-	-	-	T<Ha	-
vs.		50 %	-	-	-	-	-
Hals (Ha)		75 %	-	-	-	-	-
Ancon. (A)		25 %	-	A>Hi	A>Hi	A>Hi	-
vs.		50 %	-	-	-	-	A>Hi
Hinterh. (Hi)		75 %	-	-	-	-	A>Hi
Ancon. (A)		25 %	-	-	-	-	-
vs.		50 %	-	-	-	-	-
Hals (Ha)		75 %	-	-	-	-	-
Hinterh. (Hi)		25 %	-	Hi<Ha	Hi<Ha	Hi<Ha	-
vs.		50 %	-	-	-	Hi<Ha	-
Hals (Ha)		75 %	-	-	-	-	Hi<Ha

1) - = kein Unterschied

2) T>A (Ha, Hi) = Unterschied mit $p < 0,05$ gesichert

Die AUC (25 % und 50 % von Cmax) waren nach Hinterhand-Verabreichung größer als nach s. c.-Applikation in den Hals.

Die restlichen Unterschiede treten vereinzelt bei allen Parametern u. a. bei 25 % Cmax auf.

4.3. Wirkstoffkonzentrationen in der Milch

Der Nachweis der Hemmstoffe in der Milch der behandelten Kühe aus den Versuchen 1 bis 5 unter Heranziehung des Brillantschwarzreduktionstests (3.3.4.5.) führte zu folgendem Ergebnis:

Das Ampicillin-Trihydrat (Versuch Nr. 1), das in einer Dosierung von 10 mg/kg KGW an insgesamt 3 Kühe verabreicht worden war (Tier Nr. 15, 13 und 28), war bei allen Tieren im 1. und 2. Gemelk, d. h. bis zu 24 Stunden nach der Applikation nachweisbar. Nur in einem Fall (Tier Nr. 15) konnten Wirkstoffkonzentrationen bis zu 36 Stunden (3 Gemelke) nach der Behandlung nachgewiesen werden (siehe Tabelle 39).

Zu erheblich länger nachweisbaren Wirkstoffkonzentrationen in der Milch führte die Verabreichung von 20000 IE Procaïn Penicillin G/kg KGW bei den beiden Kühen Nr. 7 und 25 (Versuch Nr. 2). Bei Kuh Nr. 7 wurden nach der Applikation s. c. in den Triel und am Hals Ausscheidungszeiten bis zu 4 1/2 Tagen bzw. 4 Tagen nachgewiesen, während nach intramuskulärer Applikation antimikrobiell wirksame Rückstände nur an den ersten beiden Tagen post appl. nachweisbar waren. Auch bei Kuh Nr. 25 wurden nach subkutaner Verabreichung des Arzneimittels länger anhaltende Wirkstoffkonzentrationen als nach intramuskulärer ermittelt. Die entsprechenden Zeitspannen lagen bei 3

und 3 1/2 Tagen (s.c. Hals und Triel) bzw. 2 und 2 1/2 Tagen (i.m. Anconaeus und Hinterhand) (siehe Tabelle 40).

Die weitaus am längsten nachweisbaren Wirkstoffkonzentrationen in der Milch ergaben sich nach intramuskulärer Verabreichung von Procain- und Benzathin Penicillin G in einer Dosierung von insgesamt 20000 IE Penicillin/kg KGW in die Anconaeusmuskulatur. Erst nach 6 1/2 (Kuh Nr. 28) bzw. 5 1/2 (Kuh Nr. 24) Tagen lagen die Wirkstoffkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Dagegen führte die i.m.-Injektion in die Hinterhand sowie die s.c.-Injektion am Hals nur zu über 3 Tage lang meßbaren Wirkstoffspiegeln; nach s.c.-Applikation in den Triel konnten Wirkstoffe in der Milch nur über 1 1/2 bzw. 2 Tage nachgewiesen werden (siehe Tabelle 41).

Die Verabreichung von Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin (Versuch Nr. 4) in einer Dosierung von insgesamt 16000 IE Penicillin und 16 mg Dihydrostreptomycin/kg KGW führte bei 3 Kühen (Nr. 3, 9 und 26) zu über 2 1/2 bis 3 Tage lang nachweisbaren antimikrobiell wirksamen Rückständen in der Milch. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den i. m.-Injektionen und der s. c.-Applikation am Hals. Bei Verabreichung in den Triel konnten Hemmstoffe nicht bzw. nur im 4. Gemelk nachgewiesen werden (siehe Tabelle 42).

Nach Zusatz von Penicillinase (siehe Versuch Nr. 4) zur selektiven Erfassung des Dihydrostreptomycins ergab sich nur in jeweils einem Gemelk ein positives Ergebnis (Nachweisgrenze für Dihydrostreptomycin: 0,05 µg/ml): Bei Tier Nr. 9 am 2. Tag post appl. im 4. Gemelk und bei Tier Nr. 3 im 1. Gemelk am Abend nach der Verabreichung (Applikation in die Hinterhandmuskulatur).

Die Verabreichung von 5 mg Oxytetracyclin/kg KGW führte zu - unabhängig von der Art der Applikation und vom Applikatonsort - 2 1/2 bis 3 Tage lang nachweisbaren

Tabelle 39: Versuch Nr. 1 (Ampicillin-Trihydrat, 10 mg/kg KGW)
Hemmstoffnachweis in der Milch der behandelten Kühe
M = Morgengemelk, A = Abendgemelk

Tier Nr.	Injektionsstelle u. Verabreichungs- zeitpunkt	Tage post appl.							Nachweis- grenze
		1	2	3	4	5	6	7	
		M	A	M	A	M	A	M	A
13	Triel	ab.	+	-	-	-	-	-	0,01 µg/ml
13	Hinterhandmuskulatur	ab.	+	-	-	-	-	-	-
13	Anconaeusmuskulatur	mo.	+	-	-	-	-	-	-
28	Anconaeusmuskulatur	ab.	+	-	-	-	-	-	-
15	Hinterhandmuskulatur	ab.	+	-	-	-	-	-	-
15	Triel	ab.	+	+	-	-	-	-	-
15	s. c. Hals	mo.	+	-	-	-	-	-	-
15	s. c. Hals	ab.	+	-	-	-	-	-	-

ab. = Abends
mo. = morgens

Tabelle 40: Versuch Nr. 2 (Procain Penicillin G; 20000 IE/kg KGW);
Hemmstoffnachweis in der Milch der unbehandelten Kühe
M = Morgengemelk, A = Abendgemelk

Tier Nr.	Injektionsstelle u. Verabreichungs- zeitpunkt	Tage post appl.										Nachweis- grenze
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	
7	Anconaeusmuskulatur	ab.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,01 IE/ml
7	Triel	ab.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
7	Hinterhandmuskulatur	ab.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
7	s. c. Hals	mo.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	

- 202 -

25	Triel	ab.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
25	Hinterhandmuskulatur	ab.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
25	s. c. Hals	ab.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
25	Anconaeusmuskulatur	mo.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

ab.=abends
mo.=morgens

Tabelle 41: Versuch Nr. 3 (Procain- und Benzathin Penicillin G; 20000 IE Penicillin/kg KGW)
Hemmstoffnachweis in der Milch der behandelten Kühe
M = Morgenmelk, A = Abendmelk

Tier Nr.	Injektionsstelle u. Verabreichungszeitpunkt	Tage post appl.							Nachweis- grenze		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A
28	Anconaeusmuskulatur mo.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
28	Triel mo.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Hinterhandmuskulatur mo.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
12	s. c. Hals mo	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
											0,01 IE/ml
24	Triel mo.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Anconaeusmuskulatur mo.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
											203

mo. = morgens

Kuh Nr. 24 stand nach 2 Versuchsdurchgängen trocken

Tabelle 42: Versuch Nr. 4 (Procain- und Benzathin Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin;
 16000 IE Penicillin und 16 mg DHS/kg KGW)
 Hemmstoffnachweis in der Milch der behandelten Kühe
 M = Morgengemelk, A = Abendgemelk
 - Ansatz ohne Zusatz von Penicillinase -

Tier Nr.	Injektionsstelle u. Verabreichungszeitpunkt	Tage post appl.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A
3	Triel	mo.	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	Anconaeusmuskulatur	mo	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	s. c. Hals	mo.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	Hinterhandmuskulatur	mo.	+	+	+	+	-	-	-	-	-
26	Anconaeusmuskulatur	mo.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
26	Triel	mo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Hinterhandmuskulatur	mo.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	s. c. Hals	mo.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
mo.=morgens											

Tabelle 45: Versuch Nr. 5 (Oxytetracyclin; 5 mg/kg KGW)
Hemmstoffnachweis in der Milch der behandelten Kühe
M = Morgengemelk, A = Abendgemelk

Tier Nr.	Injektionsstelle u. Verabreichungszeitpunkt	Tage post appl.										Nachweis- grenze
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	
9	Triel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,1 µg/ml
24	Triel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24	s. c. Hals	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24	Anconaeusmuskulatur	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	Anconaeusmuskulatur	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Anconaeusmuskulatur	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Hinterhandmuskulatur	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Triel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
mo. = morgens												

Rückständen in der Milch (siehe Tabelle 43). Für diesen Versuch gilt jedoch, daß die Nachweisgrenze mit 0,1 µg/ml vergleichsweise unempfindlich war.

4.4. Rückstände in Muskulatur und Organen der geschlachteten Versuchstiere aus den Versuchen 1 bis 6

Die Untersuchung der Fleisch- und Organproben ergab bei den Versuchen 1, 3, 4, 5 und 6 nachweisbare Rückstände der jeweiligen Arzneimittel im Injektionsstellenbereich, nicht dagegen bei Versuch Nr. 2. Nur in einem Fall (Versuch Nr. 3) wurden auch Rückstände in Leber und Nieren nachgewiesen. In der Muskulatur, die nicht aus dem Injektionsstellenbereich stammte, konnten in keinem Fall Hemmstoffe nachgewiesen werden. Das Ergebnis bei Untersuchung der Injektionsstellen nach i. m.-Verabreichung ist in Tabelle 44 zusammengefaßt. Dabei wird ersichtlich, daß die Rückstände, dargestellt am Durchmesser der Hemmhöfe (mm) in jedem Fall als ein eng begrenztes Depot in Erscheinung traten; dies gilt auch für Versuch Nr. 6, wo sich im Injektionsstellenbereich ein Hämatom gebildet hatte.

Bei Versuch Nr. 1 und Nr. 4 wurden die Untersuchungen nach zwischenzeitlicher Lagerung der Muskulatur bei -30° C nach 148 bzw. 11 Tagen wiederholt. Wie das in Tabelle 44 wiedergegebene Ergebnis zeigt, wurde ein Aktivitätsverlust nicht festgestellt.

Bei der Untersuchung der Injektionsstelle aus Versuch Nr. 3, in dem Procain- und Benzathin Penicillin G in wäßriger Zubereitung subkutan in den Trier verabreicht worden war, erwies sich ein walnußgroßes Gebilde von kalkig-schleimiger Konsistenz als Rest des Arzneimittels. Von dort entnommene Proben ergaben Hemmhöfe, die sich über die gesamte

Tabelle 44: Rückstände im Bereich der Injektionsstelle nach intramuskulärer Verabreichung
Angaben in mm-Hemmhof (Mittelwert und Standardabweichung)

Versuch Nr. u. Wirkstoff	Zeitpunkt d. Schlachtung (Tage post appl.)	Zeitpunkt d. Untersuchung (Tage nach Schlachtung)	Unter- suchung bei pH	mm-Hemmhof in Teilportionen der Injektionsstelle						
				1	2	3	4	5	6	7
1 (Ampicillin- Trihydrat)	8	2	6	n=2 2,2(0,3)	n=3 2,3(0,3)					
		15o	6		n=2 3,2(0,9)					
	2o	4	6	n=2 3,7(0,7)			n=6 11,6 (5,0)	n=8 11,9 (4,4)	n=5 2,0	n=2 5,0 (o)
4 (Procain- und Benzathin-Pen. G in Komb. m. Dihydrostrep- tomycin)		4	8				n=5 8,0 (6,1)	n=7 11,0 (4,6)	n=1 2,9	
		15	6				n=32 9,7 (3,5)	n=4 8,2 (0,9)	n=4 4,0 (1,0)	
		15	8				n=32 9,9 (3,9)			
5 (Oxytetra- cyclin)	4	2	6			n=4 4,1 (1,2)	n=2 4,5 (0,7)			
6 (Oxytetracyclin Langzeitpräp.)	2o	4	6	1)		n=8 16,6 (2,6)	n=8 16,5 (4,5)	n=8 3,2 (0,8)		

1) völlige Wachstums hemmung des Nachweiskeims

Tabelle 45: Rückstände in Fleisch und Organen nach subkutaner Verabreichung in den Trier
(Angaben in mm Hemmhof; Mittelwerte und Standardabweichung in Klammern)

Versuch Nr. u. Arzneimittel	Zeitpunkt der Schlachtung Tage post appl.	Zeitpunkt der Untersuchung nach Schlach- tung (Tage)	Unter- suchung bei pH	Leber	Niere	Fett	Musku- latur	Injektions- stelle
3 (Procain- Benzathin Peni- cillin G)	20	2	6	n=20 1,7 (0,8)	n=24 4,9 (2,1)	n=20 k.H.	n=24 k.H.	1cm Abstand: n=8 Hemmhöfe über ges. Agarplatte 2,5cm Abstand: n=8 17,1 (1,8) 5cm Abstand: n=4 9,5 (2,0) 7,5cm Abstand: n=4 kein Hemmhof 10cm Abstand: n=4 kein Hemmhof

k.H.= kein Hemmhof

Tabelle 46: Rückstände im Bereich der Injektionsstelle nach intramuskulärer Verabreichung
Angaben in µg/g Muskelgewebe (Mittelwert und Standardabweichung)
- siehe auch Tabelle 44 -

Versuch Nr. u. Wirkstoff	Zeitpunkt (Tage) post appl. Schlachtung	Zeitpunkt (Tage) nach Schlachtung Untersuchung	Unter- suchung bei pH	µg/g in Teilportionen der Injektionsstelle						
				1	2	3	4	5	6	7
6 (Oxytetra- cyclin- Langzeit- präparation)	20	6	6	n=6 k.H.	n=8 völlig ge Wachs- tums- hemmung des Nach- weis- keims	n=8 81,1 (15,2)	n=8 105,5 (15,8)	n=8 0,6 (0,1)	n=6 k.H.	n=6 k.H.

k.H. = kein Hemmhof

Nährbodenplatte ausdehnten. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 45 wiedergegeben. Sie zeigt, daß erst bei einem Abstand von mehr als 5 cm vom Zentrum der Injektionsstelle Rückstände in der aus der Halsmuskulatur entnommenen Muskelpartien nicht mehr nachweisbar waren. Weiterhin wird ersichtlich, daß die Hemmhofausbildung bei den Proben aus den Nieren deutlich stärker ausgeprägt waren als bei Untersuchung der Leberproben (Hemmhöfe von 2,0 bis 10,0 bzw. von 2,0 bis 2,6 mm Ausdehnung).

Bei der semiquantitativen Erfassung der Rückstände an den Applikationsstellen konnten nur bei den Fleischproben aus Versuch 6 Hemmstoffe nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 46 zusammengefaßt.

4.5. Ergebnis der Auswertung des Formblatts zur "praktischen Durchführbarkeit"

Die Fragebogen zu "Angaben zur Applikation von Arzneimitteln s. c. in den Triel und i. m. in den M. triceps brachii beim Rind unter Praxisbedingungen" wurden von insgesamt 11 praktizierenden Tierärzten aus dem Landkreis Nördlingen (Gruppenpraxis Nordschwaben) beantwortet. Es wurden 110 ausgefüllte Fragebögen zurückgeschickt, wovon 109 auswertbar waren.

Die prozentuale Auswertung dieser Befragung, die sich auf die Durchführbarkeit der Injektion s.c. in den Triel und i.m. in die Anconaeusmuskulatur bezog, ist in Tabelle 47 - getrennt nach Applikationsstellen - wiedergegeben. Dabei ergibt sich für die Bewertung "gut durchführbar" für beide Applikationsarten mit 67,8 % bzw. 61,4 % nur ein geringer Unterschied.

Dagegen wurde bei der s.c.-Triel-Applikation die Bewertung " unter Schwierigkeiten durchführbar" im Vergleich zur i.m.-Anconaesus-Applikation relativ häufig angegeben (19,5 % im Gegensatz zu 5,4%). Dasselbe gilt für die Bewertung "nur unter großen Schwierigkeiten", die bei Injektion in den Triel in 6 Fällen, im Vergleich zu einem Fall bei Applikation in den Anconaesus, genannt wurde.

In Tabelle 48 erfolgte eine weitere Auswertung hinsichtlich der Art der Aufstallung getrennt nach Kühen, Färsen, Kälbern und Bullen. Dabei zeigt sich, daß die Aufstellungsart "Anbindehaltung" unter allen vier Bewertungen genannt wurde. Hinsichtlich des Alters und des Geschlechts der Tiere zeigen sich keine Unterschiede.

Tabelle 47 : Auswertung Feldversuch zur Durchführbarkeit der Applikation s.c. in den Triel und i.m. in die Anconaeusmuskulatur (Absolutwerte und Prozentzahlen)

Bewertung	s.c.-Triel		i.m.-Anconaeus	
	n ¹⁾ 118		n = 184	
	abs.	%	abs.	%
gut durchführbar	80	67,8	113	61,4
zufriedenstellend durchführbar	9	7,6	60	32,6
unter Schwierigkeiten durchführbar	23	19,5	10	5,4
unter großen Schwierigkeiten durchführbar	6	5,1	1	0,5

1) n = Anzahl der behandelten Tiere

Tabelle 48: Auswertung Feldversuch zur Durchführbarkeit der Applikation s. c. in den Triel und i. m. in die Anconaeusmuskulatur in bezug auf die Art der Aufstallung bei Kühen, Färsen, Kälbern und Bullen

A.) s.c. Triel	Kühe	Färsen	Kälber	Bullen	Art der Aufstallung
gut durchführbar	36	10	29	5	Anbindehaltung, Mittellangstand, Laufstall, Boxenlaufstall, Einzelbox
zufriedenstellend durchführbar	4	2	1	2	Anbindehaltung
unter Schwierigkeiten durchführbar	9	6	4	4	Anbindehaltung, Schwenkboxen, Laufstall, Mittellangstand
unter großen Schwierigkeiten durchführbar	5		1		Halsrahmen, Anbindehaltung
B.) i.m. Anconaeus					
gut durchführbar	37	22	28	26	Anbindehaltung, Mittellangstand, Boxen, Schwenkboxen, Laufstall, Kurzstand mit Rahmen
zufriedenstellend durchführbar	23	3	31	3	Anbindehaltung, Mittellangstand, Einzelbox
unter Schwierigkeiten durchführbar	3		6	1	Anbindehaltung, Einzelbox
unter großen Schwierigkeiten durchführbar			1		Anbindehaltung

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

Zur analytischen Erfassung der herangezogenen Verbindungen sind sowohl chemisch-physikalische (Pakkala et al. 1977, Nielsson-Ehle 1977, Vree et al. 1978) als auch mikrobiologische Verfahren beschrieben worden (Coretti 1959, Pichnarcik et al. 1969, Forscher 1962, Levetzow 1971 und 1978, Ginn et al. 1978, Sjøgaard 1979). Da im Rahmen der vorliegenden Untersuchung keine Rückstandsbestimmungen durchgeführt werden sollten, sondern in erster Linie an die Erfassung therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma gedacht war, bot sich die Heranziehung eines mikrobiologischen Verfahrens an, das gleichermaßen zur Erfassung aller Wirkstoffe geeignet erschien. Es wurde daher versucht, die Analysen auf der Basis des amtlichen Hemmstofftests durchzuführen. Dieser von Levetzow (1971 und 1978) beschriebene Test läßt erwarten, daß die oben angesprochenen Hemmstoffe mit ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen werden.

Untersuchung der Blutplasmaproben

Bei der Überprüfung des o.g. Verfahrens auf seine Eignung zur Untersuchung von Plasmaproben wurden zunächst vergleichende Untersuchungen bei Einbringung des Probenmaterials in die in den Agar eingestanzten Löcher (Agarlochtest) oder Auflegen von mit Plasma getränkten Filterpapierblättchen (Blättchentest) durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Tabellen 16 a bis g zusammengefaßt und zeigt, daß beide Verfahren sich im Hinblick auf die Empfindlichkeit und Präzision praktisch nicht unterscheiden. Aufgrund der leichteren Durchführbarkeit wurde für die endgültigen Untersuchungen jedoch stets auf den Blättchentest zurückgegriffen. Lediglich im Fall der Bestimmung von Oxytetracyclin (Versuche 5 und 6) wurde der Agarlochtest durchgeführt, da - wie aus Tabelle 17 e hervorgeht - bei diesem Verfahren eine höhere Empfindlichkeit als im Blättchentest erzielt wurde.

In einer weiteren Serie von Vorversuchen wurde überprüft, inwieweit zur Verdünnung von Plasmaproben mit hohen Wirkstoffkonzentrationen sowie zum Ansetzen der Eichkurven Aqua dest., physiologische Kochsalzlösung, Phosphatpuffer (siehe Seite 98) bzw. Blutplasma herangezogen werden können bzw. müssen. Diese Versuche ergaben, wie die Tabellen 17 a bis e zeigen, daß zum Ansatz der Standardkurven für Ampicillin, Penicillin und Dihydrostreptomycin keine oder nur sehr geringgradige Unterschiede auftraten, die dahin gingen, daß bei Verwendung von Aqua dest. die größte Empfindlichkeit erreicht wurde (siehe Tabellen 17 a und b). Die entsprechenden Versuche mit Oxytetracyclin ergaben jedoch, daß hier die höchste Testempfindlichkeit erreicht wurde, wenn die Standardkurven mit Plasma einer nicht behandelten Kuh angesetzt wurden (siehe Tabelle 17 e). Bei der endgültigen Versuchsdurchführung wurden deshalb bei der Bestimmung von Oxytetracyclin Verdünnungsschritte mit Blutplasma durchgeführt, in allen anderen Fällen wurde Aqua dest. herangezogen.

Zur Bewertung der Zuverlässigkeit des angewandten Analyseverfahrens wurden neben der Charakterisierung der Stan-

dardkurven auch all die Ergebnisse herangezogen, die sich aus den positiven Kontrollen bei der Durchführung der Versuche 1 bis 6 ergaben. Wie im Kapitel 3.4.3. sowie in Tabelle 22 dargelegt wird, ergibt sich bei Auswertung von insgesamt 70 Standardkurven ein durchschnittlicher Stichprobenkorrelationskoeffizient von $0,992 \pm 0,008$. Die Wiederfindung der vorgegebenen Sollwerte ($0,25 - 12,5$ IE bzw. μg pro Eichpunkt) lag bei durchschnittlich $102,00$ ($\pm 13,6$) % bei einer Spannweite von 76 bis 134 %. Die errechneten Variationskoeffizienten lagen in einem Bereich von $0,004$ bis $0,28$, wobei sich ein Mittelwert von $0,14 \pm 0,0$ ergab. Diese die Interassay-Variabilität kennzeichnenden Daten können im Hinblick auf die Art des angewandten Analysenverfahrens (biologischer Versuch) als gut bezeichnet werden. Wie die in Tabelle 22 für Versuch 6 angegebenen Werte zeigen, ergaben sich entsprechende Daten für die Intraassay-Variabilität.

Die in Tabelle 23 zusammengefaßten Angaben (siehe Seite 140) kennzeichnen die Empfindlichkeit des angewandten Analysenverfahrens. In der Tabelle wird zunächst differenziert, inwieweit der Übergang vom negativen in den positiven Bereich definiert werden konnte und ab welcher Konzentration ein sicherer Nachweis zu führen war. Zusammenfassend ergibt sich, daß der Bereich der Nachweisgrenze für die Penicilline bei $0,125$ (Procain- und Benzathin Penicillin G) und $0,5$ (Ampicillin) IE bzw. $\mu\text{g/ml}$ lag. Für Oxytetracyclin ergab sich ebenfalls eine Nachweisgrenze von $0,5 \mu\text{g/ml}$, während die für Dihydrostreptomycin bei $4,0 \mu\text{g/ml}$ lag.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen wurden die Standardkurven stets aus den für die Behandlung verwendeten Arzneimitteln angesetzt. Sofern es sich dabei um Suspensionen handelte, wurde bei allen Pipettierschritten darauf geachtet, daß eine gleichmäßige Verteilung zum Zeitpunkt der Probenhandhabung vorlag. Dieses Vorgehen war auch bei den Penicillinen möglich, da - wie in Kapitel 3.3.1.

(Tabelle 15) dargelegt wird - sich die direkt aus dem Arzneimittel angesetzten Standardkurven nicht unterschieden zu einer Standardkurve, zu deren Ansatz gut wasserlösliches Penicillin G-Natrium herangezogen wurde. Dies stimmt u. a. mit Untersuchungen von Tobin et al. (1977) überein, die eine rasche Hydrolyse des Procain Penicillin G in wäßrigen als auch in organischen Medien nachwiesen.

Da es nicht möglich war, bei der Durchführung der Tierversuche die Vielzahl der anfallenden Plasmaproben unmittelbar nach ihrer Gewinnung auf ihren Wirkstoffgehalt zu überprüfen, erwies es sich als notwendig, praktisch alle Proben zunächst einer Gefrierkonservierung zu unterwerfen. Um zu überprüfen, inwieweit durch das Einfrieren und Wiederauftauen der Proben Wirkstoffverluste zu verzeichnen sind, wurden dazu Eichkurven in Plasma angesetzt und einem mehrmaligen Auftau- und Gefrierprozeß unterworfen. Ähnlich wurde mit aus dem Versuch gewonnenen Plasmaproben verfahren. Die in Kapitel 3.3.3. zusammengefaßten Versuchsergebnisse lassen folgende Schlußfolgerung zu: als stabil und durch den Gefrier- und Auftauprozeß praktisch nur in geringem Maße beeinflusbar erwiesen sich die oxytetracyclinhaltigen Proben. Dies bestätigen auch Untersuchungen von Honikel et al. (1978) und Nouws und Ziv (1976): Deutliche Wirkstoffverluste waren dagegen beim Ampicillin (durchschnittlich 23 %) feststellbar. In Abhängigkeit vom Arzneimittel waren derartige Wirkstoffverluste bei den anderen überprüften Penicillinen mehr oder weniger deutlich (8 - 20 %) sichtbar. Um zu überprüfen, inwieweit bereits während der Aufbewahrung der Plasmaproben im gefrorenen Zustand oder erst beim Auftauprozeß Verluste der antimikrobiellen Aktivität auftreten, wurden in einem weiteren Versuch Parallelproben nach unterschiedlich langer Aufbewahrungszeit auf ihren Wirkstoffgehalt analysiert. Wie aus Tabelle 21 (Seite 125) hervorgeht, konnten dabei weitgehend übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Soweit doch ein gewisser Unter-

schied auftrat (bei Procainpenicillin in Kombination mit Benzathinpenicillin), konnte der Unterschied nicht abgesichert werden. Es ist demnach davon auszugehen, daß die beobachteten Wirkstoffverluste - die nach einmaligem Auftauen zwischen 4 und 23 %, nach zweimaligem Auftauen zwischen 9 und 36 % lagen (siehe Tabelle 21) - vor allem während des Einfrier- oder Auftauprozesses auftreten müssen. Für die endgültige Versuchsauswertung wurden daher nur Proben herangezogen, die nach der Aufbewahrung bei -30°C nur einmal aufgetaut und sofort analysiert worden waren. Aus diesen Befunden leitet sich ab, daß die im Blutplasma tatsächlich vorhandenen Wirkstoffkonzentrationen z. T. unterschätzt wurden. Die Vergleichbarkeit der Untersuchungen untereinander bezüglich der Abhängigkeit von der Art und vom Ort der Applikation wird davon jedoch nicht beeinträchtigt.

Untersuchung von Milchproben

Der bei der Untersuchung von Milchproben angewandte Brillantschwarzreduktionstest (Kraak und Tolle 1967, Schraudy und Rauscher 1972, Balla et al. 1976, Johnson et al. 1977) ist als semiquantitatives Nachweisverfahren einzustufen, wobei die unteren Nachweisgrenzen zwischen 0,01 und 0,1 IE bzw. $\mu\text{g/ml}$ lagen (siehe Tabelle 24). Da es sich hier als notwendig erwies, die Proben bis zur analytischen Erfassung der Wirkstoffgehalte zunächst im gefrorenen Zustand aufzubewahren, wurden ebenfalls in Milch angesetzte Verdünnungsreihen eingefroren und nach unterschiedlich langen Aufbewahrungszeiten auf ihren Wirkstoffgehalt untersucht. Wie das in Tabelle 19 (Seite 121) dargestellte Ergebnis zeigt, wurden in den beiden Versuchen identische Ergebnisse erzielt, so daß geschlossen werden kann, daß während der Probenkonservierung keine oder nur geringe Wirkstoffverluste auftraten.

Untersuchung der Gewebeproben:

Die Untersuchung auf antimikrobiell wirksame Rückstände erfolgte nach der Vorschrift des amtlichen Hemmstofftestes, ohne daß zunächst weitere Variationen eingeführt worden wären. Die Ergebnisse können daher lediglich als semiquantitativ bezeichnet werden. Nur in einem speziellen Fall (siehe Kapitel 3.1.5.3.) wurde versucht, durch Homogenisierung des Gewebes und Einbringung des Homogenatüberstandes nach Zentrifugation nähere Anhaltspunkte über den tatsächlichen Wirkstoffgehalt zu bekommen. Da eine weitere Charakterisierung der Methodik nicht durchgeführt wurde, muß aber auch dieses Ergebnis noch als semiquantitativ bezeichnet werden.

Versuchsauswertung:

Zur Erfassung der Bioverfügbarkeit wurden als Kenngrößen neben der AUC t_{max} und C_{max} herangezogen. Weiterhin wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem letztmals ein positiver Meßwert im Blutplasma erhalten wurde. Desgleichen wurde bei der Auswertung bestimmt, ab wann und über welchen Zeitraum therapeutisch wirksame Blutspiegel aufrecht erhalten wurden und inwieweit zu vorgegebenen Zeitpunkten bestimmte Prozentgrenzen von C_{max} erreicht waren. Für die vorgegebenen als therapeutisch wirksam eingestuften Grenzwerte von 1 bzw. 2 $\mu g/IE/ml$ Plasma gilt, daß diese zunächst als mehr oder weniger arbiträr anzusehen sind und in erster Linie zur Charakterisierung des Arzneimittel-Verhaltens dienen sollen. Es gilt jedoch, daß in verschiedenen Arbeiten (Müller et al. 1956, Otten et al. 1965) die o. a. Werte für die in vorliegenden Untersuchungen verwendeten antimikrobiell wirksamen Stoffe auch als therapeutisch wirksam eingestuft wurden.

In bezug auf die vorgegebene Fragestellung erwies es sich weiterhin als sinnvoll, bei Vergleich der Daten nicht von den Absolutwerten, sondern von den Relativwerten auszugehen (siehe Tabelle 34 a - g). Im Hinblick auf die Gegebenheit in der tierärztlichen Praxis, in der der in-

intramuskulären Injektion in die Hinterhand eine besondere Bedeutung zukommt, wurden die für diese Art der Applikation erhaltenen Meßwerte gleich 100 % gesetzt. Durch Gegenüberstellung im Student's-t-Test sowie im Rahmen einer Varianzanalyse wurde ermittelt, inwieweit die für die einzelnen Versuchsparameter errechneten Werte vom Ort der Applikation abhängig sind.

Versuchstierbehandlungen:

Die Versuchstierbehandlungen waren in der Regel problemlos durchführbar. Allerdings wurden in einigen Fällen Nebenwirkungen beobachtet. So führten die Langzeitpräparationen Tardomyocel^R, Terramycin LA^R und Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin nach intramuskulärer und subkutaner (Hals) Verabreichung teilweise zu Unverträglichkeitserscheinungen am Ort der Applikation, wobei die beschriebenen Veränderungen meistens kurze Zeit nach der Injektion auftraten (siehe Tabellen 12 c, d, e und g). Die Verabreichung von Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R hatte relativ starke, schmerzhaftige Schwellungen zur Folge (siehe Tabelle 12 e). Aus diesen nur an wenigen Tieren gemachten Beobachtungen kann jedoch kein Einfluß auf das insgesamt erhaltene Ergebnis abgeleitet werden, wie sich letztlich auch aus den erhaltenen Meßwerten zeigt.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit in der Literatur gemachten Angaben (Doll et al. 1950, Gratzl und Jaksch 1952, Hollister et al. 1955, Shipper et al. 1971, Stover et al. 1981) wurden nach Anwendung von Procain-Penicillin G bzw. Procain- und Benzathin-Penicillin G in der vorgesehenen therapeutischen Dosierung im Mittel relativ niedrige

Wirkstoffkonzentrationen in einem Bereich von 1,2 bis 3,5 IE/ml Plasma gemessen. Lediglich in einem Fall ergab sich nach subkutaner Applikation am Hals für C_{max} ein höherer Wert von 4,8 IE/ml. Nach Anwendung therapeutischer Dosierungen von Ampicillin-Trihydrat ergaben sich für C_{max} im Mittel jedoch deutlich höhere Werte zwischen 6 bis 7 $\mu\text{g/ml}$ Plasma. Der Zeitpunkt der Wirkstoffmaxima wurde mit etwa 2 bis 3 Stunden nach der Behandlung - mit Ausnahme für die Anwendung am Triel - bestimmt. Diese Tatsache sowie die Beobachtung, daß nach Anwendung des Procain- und Benzathin-Penicillin G enthaltenden Kombinationspräparats (Versuche 3 und 4) über einen längeren Zeitraum ein Wirkstoffnachweis im Plasma gelang als nach alleiniger Anwendung von Procain-Penicillin G und Ampicillin-Trihydrat, ist ebenfalls in Übereinstimmung mit bereits früher gemachten Beobachtungen (Hollister et al. 1955, Shipper et al. 1971, Nouws und Ziv 1978).

Für Dihydrostreptomycin wurde ein relativ rascher Anstieg der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma auf Werte im Mittel bis zu 40 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen (Tabelle 30 g), die spätestens nach 23 Stunden jedoch bereits wieder unter die Nachweisgrenze des angewandten analytischen Verfahrens abgesunken waren. Über einen ähnlichen Wirkstoffverlauf berichtet Stahlheim (1970), während Mercer et al. (1971b) speziell beim Rind den Wirkstoff über 4 Tage im Plasma nachweisen konnten.

In Abhängigkeit von der Applikationsstelle ergaben sich nach Anwendung von Oxytetracyclin (Versuch Nr. 5) Wirkstoffmaxima zwischen 1,8 $\mu\text{g/ml}$ (Triel) und 3,6 $\mu\text{g/ml}$ (i. m. Hinterhand), wobei der Zeitpunkt der Wirkstoffmaxima bei 19 bzw. 3 Stunden lag. Damit ergibt sich zumindestens für die intramuskuläre Applikation sowie die Applikation subkutan am Hals Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Clark et al. 1974), die nach Verabreichung

entsprechender Dosierungen über Wirkstoffmaxima zwischen 2 bis 5 $\mu\text{g/ml}$ Serum berichten, die 4 bis 5 Stunden nach der Behandlung gemessen werden. Während nach Anwendung von Oxytetracyclin in einfacher Lösung ein positiver Wirkstoffnachweis im Plasma im Mittel nur über einen Zeitraum von 56 (im Einzelfall über 72) Stunden geführt werden konnte, gelang ein solcher Nachweis nach Anwendung des Langzeitpräparates (Terramycin LA^R, Versuch Nr. 6) über 168 Stunden. In diesem Versuch wurden Wirkstoffkonzentrationen in einem Bereich von 5,5 bis 8 $\mu\text{g/ml}$ Plasma zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10 und 1,3 Stunden post appl.) gemessen.

Für Penicilline wird berichtet, daß etwa 5 bis 20 % der im Serum nachweisbaren Wirkstoffkonzentrationen in der Milch gemessen werden können. Die Zeitdauer der Nachweisbarkeit lag dabei nach Anwendung von Procain-Penicillin G im Mittel bei 48 bis 72 Stunden und nach Anwendung von Benzathin-Penicillin G im Mittel bei 72 bis 96 Stunden (Schipper 1965, Wagenseil 1965), in einem Fall konnte jedoch die Elimination mit der Milch über 10 Tage verfolgt werden (Wright und Harold 1960). In den eigenen Untersuchungen wurden nach Anwendung von Procain-Penicillin G antimikrobiell wirksame Rückstände in der Milch über 9 Gemelke (d. h. über 5 Tage) und nach Anwendung von Benzathin-Penicillin G in einem Fall sogar bis zu 12 Gemelken (entspricht 7 Tagen) gemessen. Beide Versuche (Versuch Nr. 2 und 3) weisen auf ein unterschiedliches Rückstandsverhalten in Abhängigkeit von der Applikationsstelle und dem verwendeten Präparat hin. Während nach Anwendung von Procain- und Benzathin-Penicillin G in jedem Fall die Wirkstoffausscheidung über die Milch nach intramuskulärer Applikation in die Anconaeusmuskulatur am längsten war (6 bzw. 7 Tage), wurden nach alleiniger Verabreichung von Procain-Penicillin G (Versuch Nr. 2) im Mittel für die subkutane Applikation mit 7,5 Gemelken deutlich längere Eliminationszeiten als für die intramuskuläre Ap-

plikation mit durchschnittlich 4 Melkzeiten gemessen. Von den überprüften Penicillinen ergab sich für Ampicillin-Trihydrat die kürzeste Dauer der Nachweisbarkeit in der Milch; diese lag maximal in einem Fall bei 3 Gemelken. Auch nach Anwendung von Procain- und Benzathin-Penicillin G in Kombination mit Dihydrostreptomycin (Versuch Nr. 4) konnte nur über einen relativ kurzen Zeitraum (bis zu 3 Tagen) antimikrobiell wirksame Rückstände in der Milch nachgewiesen werden. Der sich aus diesem Versuch ergebende Unterschied zu Versuch Nr. 3, wobei praktisch bei gleicher Dosierung der Penicilline ein Wirkstoffnachweis nach i. m.-Applikation in den Anconaeus über 6 bzw. 7 Tage gelang, kann - wenn überhaupt - nur auf Unterschiede in der galenischen Zubereitung der beiden verwendeten Präparate (Tardomyocel pro inj.^R und Langzeitpenicillin-Dihydrostreptomycin^R) zurückgeführt werden. Auch nach Anwendung von Oxytetracyclin (Versuch Nr. 5) wurde ein Wirkstoffübergang in die Milch nachgewiesen. Aufgrund der relativen Unempfindlichkeit des zur Verfügung stehenden Verfahrens zum Nachweis von Oxytetracyclin (Nachweisgrenze bei 0,1 µg/ml) können jedoch keine weiteren Schlußfolgerungen im Hinblick auf mögliche Abhängigkeiten vom Ort der Applikation gezogen werden.

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, daß das Auftreten von Arzneimittelnrückständen in der Milch nach parenteraler Behandlung nicht nur von der Art des verabreichten Wirkstoffes, sondern insbesondere auch von der Zubereitung und dem Ort der Applikation abhängt. Daraus ergibt sich u. a., daß die Festsetzung präparatespezifischer Wartezeiten für Milch Rückstandsuntersuchungen mit dem jeweiligen Arzneimittel voraussetzt. Pauschalierungen erfordern in jedem Fall die Einbeziehung angemessener Sicherheitsspannen.

Die stichprobenartig bei einigen Tieren in den eßbaren Geweben durchgeführten Rückstandsuntersuchungen bestätigen

die spezielle Rückstandsproblematik an der Injektionsstelle (Bergsjö 1976). In 5 der 6 durchgeführten Versuche konnten deutliche Rückstände im Injektionsstellenbereich nachgewiesen werden, während in der Muskulatur außerhalb der Injektionsstelle in keinem Fall antimikrobiell wirksame Rückstände nachgewiesen werden konnten. Da in jedem Fall die Schlachtung erst dann vorgenommen wurde, wenn antimikrobiell wirksame Blutspiegel nicht mehr nachweisbar waren, ergibt sich, daß bei Anwendung üblicher mikrobiologischer Methoden und Untersuchung von Blutplasma nicht auf das Vorhandensein etwaiger im Organismus noch vorhandener Injektionsdepots geschlossen werden kann. Da sowohl im Hinblick auf den Verbraucherschutz (siehe Kapitel 2.2.1.) als auch auf lebensmitteltechnologische Probleme (siehe Kapitel 2.2.2.) sowie die Ableitung von Wartezeiten die Rückstände an der Injektionsstelle berücksichtigt werden müssen, kommt der Möglichkeit, eine Injektionsstelle vorab zu benennen und damit bei der Schlachtung wiederfindbar zu machen, eine erhöhte praktische Bedeutung zu.

Ein solches Injektionsstellendepot kann als ein eng umschriebener Bezirk bezeichnet werden, wie die Untersuchungen der unterschiedlichen Teilportionen aus dem Injektionsstellenbereich ergeben haben (siehe Tabellen 44 - 46). Auffallend in den vorliegenden Untersuchungen ist, daß ein Rückstandsnachweis an der Injektionsstelle 20 Tage nach der Schlachtung nicht nur für das speziell entwickelte und Oxytetracyclin enthaltende Langzeitpräparat gelang, sondern auch für die Procain- und Benzathin-Penicillin G enthaltenden Präparate (Versuch Nr. 3 und 4). Nur in einem Fall (Versuch Nr. 3) konnten auch noch in der Leber und Niere antimikrobiell wirksame Rückstände nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Wartezeit von 5 Tagen nach § 15 (2) LMBG, die aufgrund eines Widerspruchs des Herstellers gegen die vom Bundesgesundheitsamt festge-

setzte Wartezeit galt, insbesondere für die Langzeitpräparationen nicht ausreichend ist.

Die stichprobenartig bei einigen erkrankten Tieren durchgeführten Untersuchungen lassen keine eindeutigen Unterschiede im Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma zu gesunden Tieren erkennen. Es ist jedoch die Tendenz erkennbar, daß bei den erkrankten Tieren die Wirkstoffmaxima im Blutplasma früher erreicht werden als bei gesunden Tieren, wobei dies ebenfalls mit einem schnelleren Abfall verbunden ist. Anders als bei Clark et al.

(1974) ergaben sich keine Hinweise auf eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma der erkrankten Tiere im Vergleich zu gesunden Tieren.

Wie aus den oben zum Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma gemachten Ausführungen hervorgeht, lassen sich im Vergleich zu bereits früher erhobenen Befunden keine speziellen Besonderheiten erkennen. Es erscheint daher gerechtfertigt, die gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Beeinflussung der Bioverfügbarkeit in Abhängigkeit vom Ort der Applikation weitgehend auf das Rind zu übertragen. Im Hinblick darauf sowie aufgrund des nur beschränkt zur Verfügung stehenden Tiermaterials wurden die Versuche auch so aufgebaut, daß von mindestens 5 Tieren pro Versuch der Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen für jede der angesprochenen Applikationsarten bestimmt wurde.

Wie aus den Zusammenfassungen aus den Tabellen 35 und 36 hervorgeht, lassen sich signifikante Unterschiede im Arzneimittelverhalten in Abhängigkeit von der Applikationsstelle erkennen. So zeigt Tabelle 35, daß im Vergleich zur intramuskulären Injektion in die Hinterhand und gemessen an den Kriterien AUC, Cmax, tmax und Zeitpunkt des Erreichens therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen das Arzneimittelverhalten nach subkutaner Verabreichung in den Trier in 6 Fällen als ungünstiger zu beurteilen ist, während sich in einem Fall (AUC) ein höherer Wert

ergibt. Bei Verabreichung i. m. in den Anconaeus und s. c. am Hals ergibt sich dagegen aus insgesamt 10 Beobachtungen, daß das Arzneimittelverhalten lediglich in einem Fall (tmax) als ungünstiger zu beurteilen ist. Auch die einfache Auflistung der Verteilung der Abweichungen zur Injektion i. m. in die Hinterhand (siehe Tabelle 36) ergibt, daß sich die Bioverfügbarkeit - gemessen an den Parametern AUC, Cmax, tmax, Erreichen von 1 bzw. 2 µg/IE/ml/Plasma, Dauer von 1 bzw. 2 µg/IE/Plasma - nach Verabreichung des Arzneimittels subkutan in den Triel im Vergleich zu den anderen Applikationsorten schlechter darstellt. Das Verhältnis der positiven zu den negativen Beobachtungen liegt beim Triel im Mittel bei 1 : 2, während für die i.m.-Applikation in die Anconaeusmuskulatur bzw. die subkutane Applikation am Hals die Verhältnisse im Mittel bei 1 : 0,4 bzw. 1 : 0,7 liegen. Weiterhin kann die Aussage getroffen werden, daß nach Verabreichung des Arzneimittels subkutan in den Triel antimikrobiell wirksame Plasmakonzentrationen über einen längeren Zeitraum gemessen werden können als nach intramuskulärer Applikation in den Anconaeus, die Hinterhand oder nach subkutaner Applikation am Hals.

Auch die Varianzanalyse (siehe Tabellen 37 und 38, jeweils a und b) ergibt eindeutig, daß das Arzneimittelverhalten in erster Linie von der Injektionsstelle, aber auch vom Arzneimittel abhängig ist. In dieser Analyse konnte keine Abhängigkeit vom Versuchstier erkannt werden, wobei jedoch zu beachten ist, daß nur eine relativ geringe Tierzahl zur Verfügung stand. Bei Vergleich der Injektionsstellen untereinander ergeben sich keine Unterschiede zwischen i.m.-Hinterhand, i.m.-Anconaeus und s.c.-Hals, während im Sinne der bereits oben gemachten Aussagen bei Vergleich der Injektion in den Triel mit der intramuskulären Injektion in den Anconaeus und in die Hinterhand stets signifikante Unterschiede auftraten. Zum Teil zeigt sich dieser Unterschied auch bei Vergleich der Injektionsstel-

len subkutan / Triel und subkutan / Hals.

Zusammenfassend lassen die insgesamt vorliegenden Befunde demnach die Aussage zu, daß - zumindest im Hinblick auf die überprüften Arzneimittel - die Applikationsstelle Triel am ungünstigsten zu beurteilen ist, während sich zwischen den anderen drei überprüften Applikationsstellen keine Unterschiede zeigen. In Übereinstimmung mit Rutgers et al. (1980), die ähnliche Untersuchungen mit Natriumamoxicillin und Amoxicillin-Trihydrat an 5 Kühen durchführten, und im Gegensatz zu früheren Empfehlungen (Bergsjö 1976), sollte demnach der Triel nicht weiter als allgemein gut geeignete Applikationsstelle propagiert werden. Dies gilt sowohl für die Behandlung von Kühen als für die von Kälbern. Der speziell bei Kühen zu beobachtenden Bindegewebeverhärtung im Bereich des Triels kann demnach nicht die ursprünglich vermutete Bedeutung für die "Resorptionsverzögerung" zugeschrieben werden. Die durchgeführten Untersuchungen lassen weiter die Aussage zu, daß die Applikationsstelle "Triel" als eine eigenständige Applikationsstelle betrachtet werden muß und nicht mit der subkutanen Applikation, z. B. am Hals, gleichgesetzt werden kann.

5.3. Schlußfolgerungen

1. Die durchgeführten Untersuchungen haben bestätigt, daß in Abhängigkeit von der Art des Arzneimittels am Ort der Applikation erhebliche Wirkstoffmengen über längere Zeiträume liegen bleiben können. Dies gilt sowohl für die intramuskuläre als auch die subkutane Injektion. Bei diesen Depots am Ort der Applikation handelt es sich hier jedoch um eng umgrenzte Bereiche.

2. Im Hinblick auf den Verbraucherschutz (siehe Kapitel 2.2.1.) sowie lebensmitteltechnologische Fragen (siehe Kapitel 2.2.2.) kann das Rückstandsverhalten am Ort der Applikation bei der Festlegung der Wartezeiten nicht unberücksichtigt bleiben. Im Ausnahmefall könnte einer vorgezogenen Schlachtung jedoch zugestimmt werden, wenn der Ort der Applikation bekannt ist und bei der Schlachtung verworfen wird.
3. Bezogen auf die vier überprüften Applikationsstellen und die verwendeten Arzneimittel haben sich die intramuskuläre Injektion in den Anconaeus, die Hinterhand sowie die subkutane Applikation seitlich am Hals - gemessen an der Bioverfügbarkeit des Arzneimittels - als weitgehend gleich gut geeignet erwiesen. Die subkutane Applikation in den Triel kann wegen der geschmälernten Bioverfügbarkeit jedoch nur bedingt empfohlen werden. In jedem Fall erwies sich das Auffinden des Injektionsstellendepots nach intramuskulärer Injektion in den Anconaeus bei der Schlachtung als problemlos. Es muß jedoch als unmöglich angesehen werden - sofern nicht ein ganzes Hinterviertel verworfen werden soll - selektiv eine Injektionsstelle nach intramuskulärer Injektion in die Hinterhand aufzufinden.

Sofern von der Möglichkeit getrennter Wartezeiten Gebrauch gemacht werden soll, ist daher für das Rind die intramuskuläre Injektion in den Anconaeus zu empfehlen. Obwohl die vorliegende Arbeit dafür nur Anhaltspunkte liefert, ist zu erwarten, daß auch nach subkutaner Injektion am Ort der Applikation ein Depot gebildet wer-

den kann und demzufolge die unmittelbar darunter liegenden Muskelpartien mit entsprechenden Rückständen belastet sein müssen. Die selektive Entfernung dieser Muskelpartien dürfte sich in der Praxis wohl schwieriger gestalten als die Entfernung der Anconaeusmuskulatur, die ein in sich geschlossenes und am Schlachtkörper leicht identifizierbares Muskelpaket darstellt.

4. Auch unter den Bedingungen der tierärztlichen Praxis hat sich die intramuskuläre Injektion in den Anconaeus offensichtlich bewährt, wie der in der Gruppenpraxis Nordschwaben durchgeführte Feldversuch ergab. In 94 % der Fälle erwies sich die Art der Applikation als gut bzw. zufriedenstellend durchführbar, in 5,4 % der Fälle als unter Schwierigkeiten durchführbar und lediglich in 0,53 % als nur unter großen Schwierigkeiten durchführbar. Die entsprechende Zahl für die subkutane Applikation in den Trier liegt dagegen bei 75,19 und 6 %.
5. Im Hinblick auf die seitens des Bundesgesundheitsamtes getroffene Einführung getrennter Wartezeiten sowie das Problem der Infektionen (Abszessbildung) im Bereich der Injektionsstelle könnte daher zur weiteren Sicherung des Verbraucherschutzes bzw. aus Gründen der Fleischhygiene beim Rind die intramuskuläre Applikation in den Anconaeus als bevorzugte Applikationsstelle bindend vorgeschrieben werden.

6. Zusammenfassung

A):

In sechs getrennten Versuchsdurchgängen, wobei insgesamt 25 Rinder zur Verfügung standen, wurden vergleichende Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit verschiedener, die Wirkstoffe Ampicillin, Procain- und Benzathin Penicillin G, Dihydrostreptomycin und Oxytetracyclin enthaltender Tierarzneimittel durchgeführt. Jedes Tier wurde pro Versuch viermal behandelt, wobei in unabhängiger Reihenfolge die folgenden Applikationsarten- und -stellen gewählt wurden: i.m.-Ellbogenmuskulatur (Anconaeusmuskulatur), i.m.-Hinterhandmuskulatur, s.c.seitlich am Hals und s. c. in den Triel. Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Behandlungen waren so gewählt worden, daß mindestens über eine Dauer von 10 Tagen antimikrobiell wirksame Rückstände im Blutplasma nicht mehr nachweisbar waren.

B):

Untersucht wurden der Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma, in der Milch sowie die Rückstandskonzentrationen im Bereich der Injektionsstelle und anderen eßbaren Geweben zu vorgegebenen Schlachtzeitpunkten von je einem Tier aus den 6 Versuchen. Zur Anwendung kamen mikrobiologische Verfahren, wobei für die Rückstandsuntersuchungen im Gewebe bzw. die Untersuchungen der Milchproben der amtliche Hemmstofftest bzw. der Brillantschwarzreduktionstest übernommen wurden. Basierend auf dem amtlichen Hemmstofftest wurden zur Erfassung des Verlaufes der Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma analytische Verfahren eingerichtet, deren Zuverlässigkeit (Spezifität, Präzision, Wiederholbarkeit, untere Nachweisgrenze) abgesichert werden konnten. Dabei zeigte sich, daß im Rahmen der unvermeidlichen Gefrierkonservierung der Blutplasmaproben mit Wirkstoffverlusten zu rechnen ist, die mit ca. 24 % beim Ampicillin

cillin am deutlichsten und mit ca. 4 % beim Oxytetracyclin am wenigsten in Erscheinung traten. Anhaltspunkte für entsprechende Verluste ergaben sich nicht bei der Untersuchung der Milch- und Gewebeproben.

C):

Bei Untersuchung der Plasmaproben wurden zur Erfassung der Bioverfügbarkeit als Kenngrößen neben der AUC (Fläche unter der Kurve), t_{max} (Zeitpunkt der maximalen Wirkstoffkonzentration), C_{max} (höchste Wirkstoffkonzentration) auch der Zeitpunkt bestimmt, zu dem letztmals ein positiver Meßwert im Blutplasma erhalten wurde. Weiterhin wurde bei der Auswertung bestimmt, ab wann und über welchen Zeitraum therapeutisch wirksame Blutspiegel und inwieweit zu vorgegebenen Zeitpunkten bestimmte Prozentgrenzen von C_{max} erreicht waren. Durch Gegenüberstellung im Student's-t-Test sowie im Rahmen einer Varianzanalyse wurde untersucht, inwieweit die für die einzelnen Versuchsparameter errechneten Werte vom Ort der Applikation bzw. von der Art des verabreichten Arzneimittels abhängig sind.

D):

Die durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, daß im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit des Arzneimittels die Applikationsstelle am Trierl am ungünstigsten zu beurteilen ist, während sich zwischen den anderen 3 überprüften Applikationsstellen keine besonderen Unterschiede ergaben. Mit nur einer Ausnahme konnten stets bei den geschlachteten Tieren Rückstände im Bereich der Injektionsstelle nachgewiesen werden. Lediglich in einem Fall waren auch Niere und Leber noch positiv, nie jedoch die Muskulatur außerhalb des Injektionsstellenbereiches. Dabei zeigte sich, daß in jedem Fall die Injektionsstelle im Bereich der Anconaeusmuskulatur bei der Schlachtung eindeutig identifizierbar und leicht entfernbar war. Für alle untersuchten Wirkstoffe konnte

ein Übergang in die Milch nachgewiesen werden. Dabei wurde jedoch festgestellt, daß dieser nicht so sehr von der Art des verabreichten Wirkstoffes, sondern vielmehr von der Zubereitung und dem Ort der Applikation abhängt.

E):

Ein parallel durchgeführter Felsversuch ergab, daß die Heranziehung der Anconaeusmuskulatur zur intramuakulären Applikation von Arzneimitteln beim Rind als relativ problemlos anzusehen ist. Sie ist bei allen Aufstallungsarten relativ leicht zugänglich und weist in der Regel eine geringere Verschmutzung mit Kot auf. Diese Aussage gilt nur bedingt für die subkutane Injektion in den Triel, wo in vielen Fällen die Zugänglichkeit erschwert ist.

F):

Aus den durchgeführten Untersuchungen wird die Folgerung gezogen, daß aufgrund der gegebenen Bioverfügbarkeit sowie im Hinblick auf die Rückstandsproblematik am Ort der Applikation die Anconaeusmuskulatur beim Rind als Stelle für die intramuskuläre Injektion bindend vorgeschrieben werden könnte. Unbeschadet der geschmä-
lerten Bioverfügbarkeit, wie sie insbesondere nach subkutaner Applikation der Arzneimittel in den Triel festgestellt werden konnte, kann die subkutane Verabreichung "allgemein" deshalb nicht als eine echte Alternative empfohlen werden, da auch nach dieser Art der Applikation mit Rückstandsbildung im darunter liegenden Muskelgewebe zu rechnen ist, wobei eine Definition und selektive Entfernung der rückstandshaltigen Muskelpartien bei vorzeitiger Schlachtung nur schwer möglich sein wird.

8. Summary

- A) In six different series of experiments, using a total of 25 cattle investigations on the bioavailability of veterinary drugs containing ampicillin, procaine- and benzathine penicillin G, dihydrostreptomycin or oxytetracycline were performed. Each animal was treated four times per experiment and in random sequence the following sites and modes of application were chosen: i.m.-muscles at the elbow (anconaeus), i.m.-hindquarter, s.c.-side of the neck and s.c.-dewlap. Time intervals between treatments were as such that for a minimum of 10 days no antimicrobial active residues could be detected in blood plasma.
- B) The profile of antimicrobial plasma- and milk concentrations was established. Further on one animal per experiment was slaughtered at fixed points of time and residues at the site of application and other tissues were determined. Microbiological assays were used. For tissue and milk analysis the official inhibition test and reduction test with brilliant black were applied, resp. For plasma analysis methods based on the official inhibition assay were developed and their reliability (specificity, precision, reproducibility and sensitivity) was established. In the course of this work it was shown, that freezing the plasma samples for storage caused a loss in antimicrobial activity, which was most pronounced in the case of ampicillin (24 %) and considerably less in the case of oxytetracycline (4 %). No such losses were observed in the case of milk samples.

- C) In respect to the plasma measurements and the bioavailability the following parameters were determined:
- AUC (area under the curve), t_{max} (time of maximum concentration in plasma), C_{max} (highest concentration determined in plasma), time of last positive blood sample. Furtheron the time course of therapeutically active plasma concentrations was established and to what degree at fixed points of time C_{max} (%) had been reached. Applying Student's t-test and an analysis of variance it was calculated, to which extent the values established for the above given parameters are a function of the site and mode of application.
- D) It was demonstrated that s.c.-injection into the dewlap resulted in the lowest bioavailability whereas no differences were obvious between the other three sites of application. With only one exception residues were always found at the injection site. However, muscle apart from the site of application was always negative and in only one animal also liver and kidney were found to be positive. When slaughtering the animal identification and removal of the circumscribed injection site "elbow" (anconaeus) was easily done and caused no problems. For all drugs used a passage into the milk-compartment was demonstrated, and apparently this was more related to the site of application and formulation than the type of drug.

- E) In a field study it was further demonstrated that - different to the s.c.-injection into the dewlap - placing i.m.-injections into the elbow-muscles (anconaeus) seems to be without any problems in cattle. This injection site is easy to reach and normally it is less contaminated with feces than the hindquarter.
- F) From the experiments performed it is concluded that in respect to the given bioavailability and the special residue situation at the site of application following the i.m.-injection, the elbow-muscles (anconaeus) could be declared as the recommended site of injection in cattle. Irrespectively of the hampered bioavailability of the drugs following s.c.-injection into the dewlap, s.c.-injection only can not be classified as a general and efficient substitute for i.m.-applications; thus also following s.c.-injections depots of the drug applied form in the adjacent muscle layers which, in the case of early slaughter, can only be removed selectively with great difficulties.

7. Literaturverzeichnis

- Baggot, J. D., Powers, T. E., Kowalski, J. J. & Kerr, K. M.
(1977): Pharmacokinetics and Dosage of Oxytetracycline in
Dogs
Res. Vet. Sci. 24, 77-81
- Balla, W., Hoog, M., Frieß, H. & Müller, W. D. (1976):
Über den Antibiotikaeinsatz bei der Uterusbehand-
lung des Rindes und die Ergebnisse der Überprüfung
der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest
auf Hemmstoffe
Tierärztl. Umsch. 31, 303-307
- Barbhaiya, R. H., Turner, P. & Shaw, E. (1977):
A Simple, Rapid Fluorimetric Assay of Amoxycillin
in Plasma
Clin. Chim. Acta 77, 373-377
- Barke, A. (1943):
Der Einfluß des hydrostatischen Druckes auf die
Resorption aus der Subkutis
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pharm 202, 194-200
- Barza, M. D. (1976):
Antimicrobial Spectrum, Pharmacology, and Therapeutic
Use of Antibiotics. II. Penicillins
J. of the Maine Medical Association 67,
377-386
- Barza, M. & Scheife, R. T. (1976):
Antimicrobial Spectrum, Pharmacology, and Therapeutic
Use of Antibiotics. I. Tetracyclins
J. of the Maine Medical Association 67,
368-376

Becker, W. (1976):

Zur Möglichkeit einer Allergisierung und Auslösung allergischer Erscheinungen nach oraler Aufnahme von antibiotikahaltigen Lebensmitteln (Literaturauswertung)
Arch. Lebensmittelhyg. 27, 161-195

Bergsjö, T. (1976):

A Comparison of Serum Concentrations of Penicillin after Intramuscular Injection and Subcutaneous and Deep Injection into the Dewlap in Cattle.
Acta vet. scand. 17, 495-500

Blobel, H. & Burch, C. W. (1960):

Penicillin in Milk of Cows Following Intramuscular Administration
J. Amer. Vet. Med. Assn. 136, 477-480

Bossuyt, R., Renterghem, R. & Waes, G. (1976):

Identification of Antibiotic Residues in Milk by Thin-Layer Chromatography
J. Chromatogr. 124, 37-42

Brüggemann, J., Lösch, U., Merckenschläger, M. & Offterdinger, I. (1965): Ablagerung von Tetracyclin im Knochengewebe von Tieren bei Zusatz von Tetracyclin zum Futter

Zbl. Vet. Med. Reihe A, 13, 59-74

Brummer, H. (1967):

Die Vornahme von Injektionen in Anpassung an tierartspezifisches Verhalten
Praktische Tierarzt 48, 147-149

Bucher, . (1973):

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
8. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien
S. 202-203

- Cannon, R. Y. & Hawkins, G. E. (1962):
Duration of Secretion of Bacteriostatic Drugs
in Milk. I. Penicillin Following Oral and Paren-
teral Administration
J. Dairy Sci. 45, 769-773
- Chopra, I. & Howe, T. G. B. (1978):
Bacterial Resistance to the Tetracyclins
Microbiol. Rev. 42, 707-724
- Clark, C. H. (1976):
Penicillins in Veterinary Practice
Mod. Vet. Pract. 57, 1019-1023
- Clark, C. H. (1977):
Toxicity of Aminoglycoside Antibiotics
Mod. Vet. Pract. 58, 594-598
- Clark, J. G., Adams, C., Addis, D. G., Dunbar, J. R.,
Hinman, D. D. & Lefgreen, G. P. (1974):
Oxytetracycline Blood Serum Level Studies in
Healthy, Pneumonic and Recovered Cattle
Vet. Med. & Small Animal Clinician 69,
1542-1548
- Cogan, T. M. (1972):
Susceptibility of Cheese and Yoghurt Starter Bac-
teria to Antibiotics
Appl. Microbiol. 23, 960-965
- Coretti, K. (1959):
Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen in
Gelatine
Fleischwirtschaft 11, 737-739
- Doll, E. R., Wallace, M. E. & McCollum, W. H. (1950):
Serum Levels of Horse Following Intramuscular In-

jection of Aqueous Suspension of Procaine Penicillin
Vet. Med. 65, 309-310

Dürr, A. (1976):

Comparison of the Pharmacokinetics of Penicillin G
and Amoxycillin in the Horse
Res. Vet. Sci. 20, 24-29

English, P. B. (1965):

The Therapeutic Use of Penicillin: The Relationship
between Dose Rate and Plasma Concentration after
Parenteral Administration of Benzylpenicillin
Vet. Rec. 77, 810-814

Evans, E. F., Proctor, J. D., Fraktin, M. J.; Velandia,
J. & Wasserman, A. J. (1974):

Blood Flow in Muscle Groups and Drug Absorption
Clin. Pharm. Therap. 17, 44-47

Forschner, E. (1962):

Hemmstoffe in Organen von Schlachttieren
Arch. Lebensmittelhyg. 13, 242-245

Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. (Hrsg.) (1980):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxiko-
logie, Bibliographisches Institut Mannh./Wien/Zürich
Kap. Antibiotika und Chemotherapeutika S. 460 ff.

Galtier, P. & Charpentreau, J. L. (1979):

Pharmacokinetics of Ampicillin in Pigs
J. vet. Pharmacol. Therap. 2, 173-180

Geißler, A. (1956):

Der Penicillingehalt in den Geweben und seine Be-
deutung für die Penicillintherapie
Monatsh. Veterinärmed. 11, 121-130

- Ginn, R. E., Tatini, S. & Packard, V. S. (1978):
Comparative Evaluation of the Difco Disc Assay
Method for Detecting Penicillin in Milk and Milk
Products
J. of Food Protection 41, 361-363
- Goodman Gilman A., Goodman L.S. & Gilman A. (1980)
The Pharmacological Basis of Therapeutics
Sixth Edition, Macmillan Publishing Co. Inc. New
York
Kap. XII: Chemotherapy of Microbial Diseases
- Gratzl, E. & Jaksch, W. (1952):
Der Penicillinblutspiegel bei Pferd, Rind und Hund
Wien. Tierärztl. Monatsschr. 39, 144-169
- Groothuis, D. G. & Werdler, M. E. B. (1980):
Factors Affecting the Absorption of Ampicillin
Administered Intramuscularly in Dwarf Goats
Res. Vet. Sci. 29, 116-117
- Hammond, P. B. (1953):
Dihydrostreptomycin Dose-Serum Level Relationships
in Cattle
J. Amer. Vet. Med. Assn. 122, 203-206
- Hauschild, F. (1973):
Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie
VEB Georg Thieme Verlag Leipzig
Kap. Wirkungsbedingungen von Pharmaka S. 9 ff. und
Kap. Antibiotika S. 193 ff.
- Høgh, P. & Rasmussen, F. (1972):
Koncentrationer af tetracyclin i blodplasma og
mælk hos køer efter intramuskulær injektion af
tetracyclin og tetracyclin med benzydamin
Nord. Vet. Med. 24, 11-16
- Hollister, C. J., Huebner, R. A., Boucher, W. B. & DeMott,
T. (1955):
Bovine Antibiotic Blood Levels Obtained with

Antibiotics in Oil Suspensions

Am. J. Vet. Res. 16, 391-393

Honikel, K. O., Schmidt, U., Woltersdorf, W. & Leistner, L. (1978):

Effect of Storage and Processing on Tetracycline Residues in Meat and Bones

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1222-1227

Huebner, R. A. (1971):

Therapeutic Serum Concentrations of Penicillin

J. Amer. Vet. Med. Assn. 159, 757-759

Idsoe, O., Willcox, R. R. & DeWeck, A. L. (1969):

Art und Ausmaß der Penicillinnebenwirkungen unter Berücksichtigung von 151 Todesfällen nach anaphylaktischem Schock

Schweiz. med. Wschr. 99, 1221-1229

Johnson, M. E., Martin, J. H., Baker, R. J. & Parson, J. G. (1977):

A Comparison of Several Assay Procedures to Detect Penicillin Residues in Milk

J. of Food Protection 40, 785-789

Kelch, F. & Coretti, K. (1959):

Zum Nachweis von Aureomycin in Fleisch und Organproben von Schlachttieren

Fleischwirtschaft 11, 358-359

Kielwein, G. (1976):

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene

Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg

Kap. Rückstände in Milch und Milcherzeugnissen S.84 ff.

Klima, H. (1966):

Zur Frage des Hemmstoffnachweises anlässlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Fleischwirtschaft 12, 1347-1349

- Knothe, H. (1968):
Anwendung von Antibiotika in der Tierernährung im
Hinblick auf die menschliche Gesundheit
Antibiotica et Chemotherapia 14, 217-250
- Knothe, H. (1963):
Darmflora und Antibiotika unter Berücksichtigung der Tetracycline
Dtsch.med.Wschr. 88, 1469-1477
- Kraak, J. & Tolle, A. (1967):
Brillantschwarz-Reduktionstest mit Bac. stearootherophilus var. calidolactis zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch
Milchwissenschaft 22, 669-673
- Lang, E. (1977):
Die Aminoglycosid-Antibiotika
Der Arzneimittelbrief 11, 105-112
- Lebek, G. (1981):
Ausführungen vor der mündlichen Verhandlung
14. Kammerverwaltungsgericht Berlin am 24. 8. 1981
- Levetzow, R. (1971):
Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)
Bundesgesundheitsblatt Nr. 15/16, 211-213
- Levetzow, R. (1978):
Zur Entwicklung eines EG-Standards für den Nachweis von Hemmstoffen in Fleisch
Fleischwirtschaft 58, Nr. 5, 868-870
- Liedtke, R. K. (Hrsg.) (1980):
Wörterbuch der Klinischen Pharmakologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1980
S. 93-94

- Loftsgaard, G., Briskey, E. J., Nes, N. & Olson, C. (1969):
Residual Penicillin in the Tissues of Pigs
Am. J. Vet. Res. 29, 1613-1618
- Malten, K. E. (1968):
Allergy to Antibiotics in Minute Amounts in Foods
Nutritio et Dieta 10, 184-194
- Mercer, H. D., Geleta, J. N., Carter, G. G. & Kramer, J.
(1970):
Dihydrostreptomycin: Tissue Residues and Certain
Pharmacologic Properties in Swine
Am. J. Vet. Res. 31, 1589-1593
- Mercer, H. D., Richter, H. F. & Carter, G. G. (1971) (a):
Serum Concentrations of Penicillin and Dihydrostrepto-
mycin After Their Parenteral Administration in Swine
J. Amer. Vet. Med. Assn. 159, 61-65
- Mercer, H. D., Rollins, L. D., Garth, M. A. & Carter, G. G.
(1971) (b):
A Residue Study and Comparison of Penicillin and
Dihydrostreptomycin Concentrations After Intra-
muscular and Subcutaneous Administration in Cattle
J. Amer. Vet. Med. Assn. 159, 776-779
- Mercer, H. D., Teske, R. H., Long, P. E. & Showalter,
D. H. (1978):
Drug Residues in Food Animals. II. Plasma Tissue
Kinetics of Oxytetracycline in Young Cross-Bred
Swine
J. vet. Pharmacol. Therap. 1, 119-128
- The Merck Index (1976):
Ninth Edition S. 1170
- Meyer Jones, L., Booth, N. H. & McDonald L. E. (Hrsg.) (1977):
Veterinary Pharmacology and Therapeutics
The Iowa State University Press
Section 13: Chemotherapy of Microbial, Fungal, and
Viral Diseases

- Müller, L. F., Tützer, G., Fischer, S. & Dangschat, O. (1956)
Untersuchungen über den Penicillin-Butserumspiegel
beim Schwein
Berl. Mün. Tierärztl. Wschr. 18, 362-364
- Nilsson-Ehle, I. (1977):
High-Pressure Liquid Chromatography as a Tool
For Determination of Antibiotics in Biological
Fluids
Acta path. microbiol. scand. Sect. B. 259, 61-66
- Nouws, J. F. M. & Ziv, G. (1976):
The Effect of Storage at 4° C on Antibiotic
Residues in Kidney and Meat Tissues of Dairy Cows
Tijdschr. Diergeneesk. 101, 1145-1153
- Nouws, J. F. M. & Ziv, G. (1977) (a):
Distribution und Rückstände von Tetracyclinen in
den Geweben normal geschlachteter und notgeschlach-
teter Rinder
SVZ Schlachten und Vermarkten 77, 220-225
- Nouws, J. F. M. & Ziv, G. (1977) (b):
Tissue Distribution and Residues of Aminoglycoside
Antibiotics in Normal Dairy Cows
Tijdschr. Diergeneesk. 102, 149-158
- Nouws, J. F. M. & Ziv, G. (1978) (a) :
Tissue Distribution and Residues of Benzylpenicillin
and Aminoglycoside Antibiotics in Emergency-
Slaughtered Ruminants
Tijdschr. Diergeneesk. 103, 140-151
- Nouws, J. F. M. & Ziv, G. (1978) (b) :
A Kinetic Study of Beta-Lactam Antibiotic Residues
in Normal Dairy Cows
Zbl. Vet. Med. A 25, 312-326

- Otten, H., Plempel, M. & Siegenthaler, W. (Hrsg.) (1975):
Antibiotika-Fibel
Georg Thieme Verlag Stuttgart
S. 23 ff., S. 170 ff., S. 320 ff. und S. 362 ff.
- Owen, L. N. (1965):
Veterinary Applications of the Tetracyclins
Vet. Bull. 35, 331-345
- Pakkala, P., Stabel-Taucher, R. & Pekkanen, T. J. (1976):
Oxytetracycline Residues in Meat and Kidney Tissue
after Intramuscular or Intramammary Treatment as
Determined by a Chemical-Physical Method and Com-
pared to a Microbiological Method
Nord. Vet. Med. 28, 610-614
- Pappenheimer, J. R. (1953):
Passage of Molecules Through Capillary Walls
Physiol. Rev. 33, 387-423
- Pichnarcik, J., Wenzel, S. & Gißke, W. (1969):
Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in
Organen und Muskulatur von Schlachttieren
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 272-279 '9
- Pilloud, M. (1973):
Pharmacokinetics, Plasma Protein Binding and Do-
sage of Oxytetracycline in Cattle and Horses
Res. Vet. Sci. 15, 224-230
- Prouty, C. C. (1961):
Further Observations of Penicillin Levels in Milk
Following Intramuscular and Intrauterine Admini-
stration
J. Milk Food Technol. 24, 356-357
- Rasmussen, F. & Høgh, P. (1971):
Irritating Effect and Concentrations at the In-
jection Site After Intramuscular Injection of

Antibiotic Preparations in Cows and Pigs
Nord. Vet. Med. 23, 593-605

Rutgers, L. J. E., Miert, J. P. A. M. van, Nouws, J. F. M.
& Ginneken, C. A. M. van (1980):

Effect of the Injection Site on the Bioavailability
of Amoxycillin Trihydrate in Dairy Cows
J. vet. Pharmacol. Therap. 3, 125-132

Scheibner, G. (1972):

Untersuchungen über die Beeinflussung der Roh-
wurstreifung durch Verwendung von antibiotikahal-
tigem Fleisch
Monatsh. Veterinärmed. 27, 941-943

Schmidt, U. (1976):

Rückstände von Procain Penicillin G nach intramuskulärer
Verabreichung an Schweine
Tierärztl. Praxis 4, 199-202

Schou, J. (1961):

Absorption of Drugs From Subcutaneous Connective
Tissue
Pharmacol. Rev. 13, 441-464

Schraudy, E. & Rauscher, W. (1972):

Ein Beitrag zum Nachweis von Antibiotika in der
Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 117-121

Schwartz, M. L., Meyer, M. B., Covino, B. J., Narang, R. M.,
Sethi, V., Schwartz, A. J. & Kamp, P. (1974):

Antiarrhythmic Effectiveness of Intramuscular
Lidocaine: Influence of Different Injection Sites
The Journ. of Clin. Pharm., 14, 77-83

- Siddique, I. H., Battle, W. & Blackledge, G. T. (1968):
Penicillin Concentration in Canine Blood and Urine
After Intramuscular Injection
J. Amer. Vet. Med. Assn. 152, 631-633
- Shah, P. M. & Stille, W. (1973):
Über die antibakterielle Wirkung subinhibitorischer
Tetracyclin-Konzentrationen
Infection I, 110-112
- Shipper, I. A. (1965):
Milk and Blood Levels of Chemotherapeutic Agents
in Cattle
J. Amer. Vet. Med. Assn. 147, 1403-1407
- Shipper, I. A., Filipous, D., Ebeltoft, H. & Schermeister,
L. J. (1971):
Blood Serum Concentrations of Various Benzyl
Penicillins After Their Intramuscular Administration
to Cattle
J. Amer. Vet. Med. Assn. 158, 494-500
- Søgaard, H. (1979):
An Improved Microbiological Procedure For Detection
of Streptomycin Residues in Milk and Animal Tissues
Acta vet. scand. 20, 38-44
- Stalheim, O. H. V. (1970):
Absorption and Excretion of Tritiated Dihydrostrep-
tomycin in Cattle and Swine
Am. J. Vet. Res. 31, 497-500
- Stone, P. W. & Miller, W. B. (1949):
Mobilization of Radioactive Sodium from Gastrocne-
mius Muscle of Dog
Soc. exp. Biol. 71, 529-534

Stover, S. M., Brown, M. P., Kelly, R. H., Farver, T. B. & Knight, K. D. (1981):

Aqueous Procaine PenicillinG in the Horse:
Serum, Synovial, Peritoneal, and Urine Concentrations
After Single-Dose Intramuscular Administration
Am. J. Vet. Res. 42, 629-631

Terplan, G., Zaadhof, K. J. & Angersbach, H. (1979):
Vorkommen und Bedeutung von Antibiotika-Rückständen
in Lebensmitteln

Arch. Lebensmittelhyg. 30, 197-202

Teske, R. H., Rollins, L. D. & Carter, G. G. (1972):
Penicillin and Dihydrostreptomycin Serum Concentrations After Administration in Single and Repeated Doses to Feeder Steers
J. Amer. Vet. Med. Assn. 160, 873-878

Tobin, T., Tai, C. Y., O'Leary, J., Sturma, L. & Arnett, S. (1977):

Pharmacology of Procaine in the Horse: Evidence
Against the Existence of a "Procaine Penicilline"
Complex

Am. J. Vet. Res. 38, No. 4, 437-442

Tscheuschner, I. (1972):

Anaphylaktische Reaktion auf Penicillin nach
Genuß von Schweinefleisch

Zbl. Haut-Geschlechts-Krankheiten 47, Nr. 14,
591-592

Vickers, H. R., Bagratuni, L. & Alexander, S. (1958):

Dermatitis Caused by Penicillin in Milk
The Lancet, Feb. 1958, 351-352

Vree, T. B., Hekster, Y. A., Baars, A. M. & Kleijn, E. van der (1978):

Rapid Determination of Amoxycillin (Clamoxyl^R) and
Ampicillin (Penbritin^R) in Body Fluids of Many by

Means of High-Pressure Liquid Chromatography
J. Chromatogr. 145, 496-501

Wagenseil, F. (1967):

Die Ausscheidung verschiedener Penicillinarten in
der Milch nach intramuskulärer Verabreichung
Vet. med. Diss. München

Weingärtner, L. (1964):

Zur Polymorphie allergisch bedingter Hauterkrankun-
gen bei Penicillinbehandlung
Dtsch. med. Wschr. 89, Nr. 23, 1115-1124

Welsh, M., Langer, P. H., Burkhart, R. L. & Schroeder,
C. R. (1948):

Penicillin Blood and Milk Concentrations in the
Normal Cow Following Parenteral Administration
Science 108, 185-187

Wepf, R. (1948):

Über den Resorptionsweg subcutan verabfolgter Sub-
stanzen
Schweiz. Med. Wschr. 22 537-539

Wright, W. W. & Harold, L. C. (1960):

Antibiotic Residues in Milk After Parenteral and
Oral Administration in Cows
J. Amer. Vet. Med. Assn. 137, 525-533

Ziv, G., Bogin, E., Shani, J. & Sulman, F. G. (1974):
Penetration of Radioactive-Labeled Antibiotics
From Blood Serum Into Milk in Normal and Mastitic
Ewes

Ann. Rech. vétér. 5, 15-28

LEBENS LAUF

- Gabriele Mölle geboren am 1.11.1952 in Augsburg
als Tochter des Maschinenbauingenieurs
Heinrich Mölle und seiner Ehefrau
Wilhelmina Mölle, geb. Gebser
- Schulbildung: 1959-1963 Besuch der Volksschule
in Augsburg und Buenos Aires
1963-1972 A.B. von Stettensches Institut
(neusprachliches Gymnasium) in Augsburg
1972 Abitur
- Studium: 1972-1978 Freie Universität Berlin
am Fachbereich Veterinärmedizin
9.6. 1978 Erteilung der Approbation
als Tierarzt

Von September 1978 bis Juli 1981 war ich als wissenschaftliche Angestellte beim Bundesgesundheitsamt in Berlin tätig und fertigte dort die vorliegende Dissertation an. Seit September 1981 arbeite ich in der Landesanstalt für Veterinärmedizin in Berlin in der Abteilung für Virologie.

Herrn Professor Dr. B.Hoffmann möchte ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. Mülling gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas.

Bei Herrn Meister und bei allen Mitarbeitern aus dem Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin bedanke ich mich für die großzügige Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern aus dem Laborbereich und aus dem Versuchsgut Marienfelde, die mir bei der Durchführung der Versuche geholfen haben, sowie den Tierärzten der Gruppenpraxis Nordschwaben.

